

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

“Distância e padrões de dispersão contemporânea de pólen e sistema de reprodução em pequeno fragmento isolado de *Copaifera langsdorffii* Desf. (LEGUMINOSAE – CAESALPINOIDEAE)”

RICARDO DE OLIVEIRA MANOEL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

“Distância e padrões de dispersão contemporânea de pólen e sistema de reprodução em pequeno fragmento isolado de *Copaifera langsdorffii* Desf. (LEGUMINOSAE – CAESALPINOIDEAE)”

RICARDO DE OLIVEIRA MANOEL
Biólogo

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Magno Sebbenn

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia - UNESP – Campus de Ilha Solteira, para obtenção do título de Mestre em Agronomia.
Especialidade: Sistemas de Produção

Ilha Solteira – SP
fevereiro/2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da UNESP - Ilha Solteira.

M285d Manoel, Ricardo de Oliveira.
Distância e padrões de dispersão contemporânea de pólen e sistema de reprodução em pequeno fragmento isolado de *Copaifera Langsdorfii* Desf. (Leguminosae – Caesalpinoideae) / Ricardo de Oliveira Manoel. -- Ilha Solteira : [s.n.], 2011
72 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de Produção, 2011

Orientador: Alexandre Magno Sebbenn
Inclui bibliografia

1. Análise de paternidade. 2. Espécies arbóreas tropicais. 3. Fluxo gênico.
4. Genética de populações. 5. Tamanho efetivo.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Distância e padrões de dispersão contemporânea de pólen e sistema de reprodução em pequeno fragmento isolado de *Copaifera langsdorffii* Desf. (LEGUMINOSAE - CAESALPINOIDEAE)

AUTOR: RICARDO DE OLIVEIRA MANOEL

ORIENTADOR: Prof. Dr. ALEXANDRE MAGNO SEBBENN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA ,
Área: SISTEMAS DE PRODUÇÃO, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ALEXANDRE MAGNO SEBBENN
Instituto Florestal de São Paulo - Ifsp - Secret. do Meio Ambiente / Instituto de Botanica

Prof. Dr. MARIO LUIZ TEIXEIRA DE MORAES
Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Profa. Dra. ANANDA VIRGINIA DE AGUIAR
EMBRAPA FLORESTAS - Colombo/PR

Data da realização: 11 de fevereiro de 2011.

DEDICO

*Aos meus pais,
Jesus Manoel e Nereide de Oliveira Coqueiro Manoel,
por minha vida, amor, carinho, dedicação, ensinamentos e força dedicados todos estes anos.*

OFEREÇO

*À Minha irmã Leticia de Oliveira Manoel, meus tios Josefa Silva Manoel e Renato Silva,
pelo apoio, paciência, companheirismo, compreensão, carinho e amor.
Ofereço com todo meu apreço à minha família, aos meus amigos e a todos que compreendem a
importância de se conservar nossos recursos naturais.*

“A ciência será sempre uma busca, jamais um descobrimento real.

É uma viagem, nunca uma chegada”.

Karl Poppe

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pela minha vida, saúde e paz, por sempre estar iluminando meu caminho, dando-me sempre força e fé para vencer mais uma etapa.

À Faculdade de Engenharia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Ilha Solteira (FEIS/ UNESP), pela oportunidade concedida no curso de pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro na realização deste trabalho, pela bolsa concedida durante o Mestrado, permitindo assim uma dedicação integral à pesquisa e pelo apoio financeiro para participação em eventos científicos.

Ao Prof. Dr. Alexandre Magno Sebbenn pela oportunidade, orientação, dedicação, confiança, apoio e pelos ensinamentos que enriqueceram o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mário Luiz Teixeira de Moraes, por confiar no meu potencial, pelo incentivo, dedicando muitas vezes parte de seu tempo para transmitir ensinamentos.

A Companhia Energética do Estado de São Paulo (CESP), pela estrutura e tratamentos fornecidos às mudas para posterior utilização em laboratório.

Aos professores do curso de Pós Graduação que contribuíram para minha formação acadêmica e profissional.

À Selma Maria Bozzite de Moraes, pelos ensinamentos, palavras amigas e confiança a mim depositada.

À Prof.^a Dra. Maria José Neto, pelos ensinamentos, pelo incentivo e principalmente por confiar no meu potencial.

À pesquisadora da EMBRAPA/Floresta Ananda Virginia de Aguiar e ao Prof. Dr. Mário Luiz Teixeira de Moraes pelas sugestões como membros da banca examinadora.

Ao pesquisador do Instituto Florestal de São Paulo, Miguel Luiz Menezes de Freitas pelo apoio e parceira para o desenvolvimento do trabalho.

À Prof.^a Dra. Valéria Stranghetti do Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP) e estagiários, pela parceria e apoio com relação a levantamentos florísticos.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Populações I e II (Laila, Letícia, Sirlene, Maiara, Ana Paula, Janete, Flávio, Hélio, Deise, Marcela, Jaqueline, Camila, As Éricas, Janaína, Patrícia, Thaísa, Rafael, Lívia, Milena, Daniela, Virgínea, Lorraine, Ariane, Juliana, Valter, Cecília, Pedro e Silvelise).

Aos amigos do curso de Pós Graduação pelo companheirismo e amizade, Ana Eliza, Renata, Márcia, Gustavo, Ângela, Janaína, Simone, Proença, Juliana Feres, Fabiana, Mariana, Francismary, Ana Carvalho, Jeferson, Tatiane, Jarba, Marcela Guidugli e Rômulo.

Ao meu avô, Ariston Vieira Coqueiro (in memorian) pela paciência, dedicação, compreensão e por acreditar em seus netos.

À minha irmã, Letícia, pela paciência, companheirismo e parceria.

Aos meus pais, Nereide e Jesus, que estão e sempre estiveram comigo, são meu porto seguro e que fazem com que eu enfrente os obstáculos da vida.

Aos meus tios Josefa Manoel e Renato Silva, pelo incentivo, carinho e dedicação.

Aos funcionários da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão: Alexandre (gaúcho), Alonso, Cambuim, Baiano, César e a todos os funcionários que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À equipe da Seção de Pós Graduação, especialmente a Márcia, Rafael e Onilda, pelas explicações e eficiência no trabalho realizado.

À Clarice Trindade, secretária do DFTASE, pela atenção e eficiência nos trabalhos prestados.

À equipe do Serviço de Comutação da Biblioteca, especialmente a Cristina Godoy, pelas correções, explicações e ensinamentos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

O fluxo e padrões de dispersão de pólen foram investigados em um pequeno fragmento florestal isolado da espécie arbórea neotropical, polinizada por insetos da *Copaifera langsdorffii*, por meio da análise de paternidade e oito locos microssatélites, também foi investigado a coancestria e o tamanho efetivo populacional dentro de progênies para a conservação e recuperação ambiental. Sementes de polinização aberta (20 a 25 sementes) foram coletadas de 15 árvores matrizes de um fragmento, onde todos os indivíduos adultos foram previamente mapeados, medidos e genotipados para oito locos microssatélites. Vinte sementes foram coletadas da árvore vizinha mais próxima (1,2 km) do fragmento. Os níveis de diversidade genética foram significativamente maiores nos adultos do que nas progênies. Níveis significativos de endogamia foram detectados em progênies ($F = 0,226$), o que foi atribuído principalmente ao cruzamento entre parentes. A partir da análise de paternidade, baixos níveis de autofecundação ($s = 8\%$) e imigração de pólen ($m = 8\%$) foram observados no fragmento florestal, mas níveis muito altos foram detectados na árvore isolada ($s = 20\%$; $m = 75\%$), indicando que o fragmento e a árvore não estão reprodutivamente isolados e são conectados por dispersão de pólen a longas distancias (máximo detectado 1,420 m). Dentro do fragmento, o padrão de dispersão de pólen foi o vizinho próximo, com cerca de 49% do pólen se dispersando até 50 m. O tamanho efetivo populacional da árvore-matriz foi baixa, indicando a necessidade de se coletar muitas sementes de árvores (mínimo de 76 árvores) para fins de conservação. Em termos gerais, os resultados mostraram que o fragmento e a árvore isolada pela fragmentação florestal não estão reprodutivamente isoladas, embora o isolamento espacial parecesse aumentar a taxa de autofecundação e cruzamentos correlacionados.

Palavras-chave: Análise de paternidade. Espécies arbóreas tropicais. Fluxo gênico. Genética de populações. Tamanho efetivo populacional.

ABSTRACT

Pollen flow, dispersal and patterns were investigated in a small and isolated forest fragment of the neotropical, insect pollinated tree *Copaifera langsdorffii*, using paternity analysis and eight microsatellite loci, we also investigated the coancestry and effective population size of progeny array for conservation and environmental restoration purpose. Open-pollinated seeds (20 to 25 seeds) were collected from 15 seed trees of forest fragment, where all adults trees were previously mapped, measured and genotyped by eight microsatellite loci. Twenty seeds were also collected from the neighbour tree (1.2 km) of the forest fragment. Levels of genetic diversity were significantly higher in adults than offspring. Significant levels of inbreeding were detected in offspring ($F=0.226$), which was attributed mainly to the mating among relatives. From paternity analysis, low levels of selfing ($s=8\%$) and pollen immigration ($m=8\%$) were observed in the forest fragment, but very high levels were detected in the isolated tree ($s=20\%$; $m=75\%$), indicating that the forest fragment and the tree are not reproductive isolated and are connected by long pollen dispersal (maximum detected 1,420 m). Within the forest fragment, the pattern of pollen dispersal was the near neighbor with about 49% of the pollen being dispersed until 50 m. The effective population size of the progeny array was low, indicating the necessity to collect seeds from many seed trees (minimum of 76 trees) for conservation purposes. In general terms, the results showed that the fragment and the tree isolated by forest fragment are not brooked the genetic connectivity, although the spatial isolation seems increase selfing rate and correlated mating.

Keywords: Paternity analysis. Tropical tree species. Gene flow. Population genetics. Effective population size.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Detalhes da espécie <i>Copaifera langsdorffii</i>	27
Figura 2.	Imagem aérea de parte do município de São José do Rio Preto, onde estão localizadas as árvores de <i>Copaifera langsdorffii</i> amostradas no fragmento florestal	29
Figura 3.	Distribuição espacial dos genótipos adultos de <i>Copaifera langsdorffii</i> no fragmento florestal	29
Figura 4.	Indivíduos de <i>Copaifera langsdorffii</i> amostrados no fragmento florestal	30
Figura 5.	Localização da árvore de <i>Copaifera langsdorffii</i> distante a 1,2 km do fragmento florestal	31
Figura 6.	Quantificação de DNA em gel de agarose à 1% de amostras de <i>seedlings</i> da população do fragmento florestal	32
Figura 7.	Gel de poliacrilamida 5% contendo amostras de PCR das <i>seedlings</i> procedentes da árvore isolada com o <i>primer</i> CL 06	33
Figura 8.	Gel de poliacrilamida 5% contendo amostras de PCR das <i>seedlings</i> da população do fragmento florestal com o <i>primer</i> CL 06	34
Figura 9.	Semeadura realizada no viveiro de mudas da Companhia Energética de São Paulo (CESP), localizado no município de Três Lagoas – MS	38
Figura 10.	Comparação entre a curva de distribuição de frequências de dispersão de pólen e a curva de frequência da distância entre todas as árvores e as respectivas matrizes do fragmento florestal em <i>Copaifera langsdorffii</i>	53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Sequências dos *primers* SSR descritos por Ciampi et al. (2000) para *Copaifera langsdorffii* 35
- Tabela 2.** Diversidade genética, índice de fixação e poder de exclusão de locos microssatélites em árvores adultas e sementes de árvores matrizes do fragmento florestal e isoladas de *Copaifera langsdorffii*. A é o número total de alelos; H_e é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; H_o é a heterozigosidade observada; F é o índice de fixação; $P_{2^o\ Parente}$ é a probabilidade de excluir o segundo parente (quando nenhum dos parentes é conhecido) 44
- Tabela 3.** Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução em progênies de *Copaifera langsdorffii* em uma população (fragmento florestal) 45
- Tabela 4.** Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução em árvores adultas e sementes de árvores matrizes do fragmento florestal de *Copaifera langsdorffii*. t_m é a taxa de cruzamento multilocos; $t_m - t_s$ é a taxa de cruzamento entre parentes; $r_{p(m)}$ é a correlação multilocus de paternidade; Θ é a coancestria dentro de progênie; N_e é o tamanho efetivo da progênie; média \pm erro padrão da média 95% de probabilidade 47
- Tabela 5.** Taxa de sobrevivência individual por árvore matriz de *Copaifera langsdorffii*, provenientes de árvores do fragmento florestal aos oito meses após a semeadura em viveiro 49
- Tabela 6.** Resultados da análise de paternidade e distância de dispersão de pólen em progênies de duas procedências de *Copaifera langsdorffii*. (n : tamanho amostral; s : taxa de autofecundação; δ : distância média de dispersão de pólen; A_{ep} : área efetiva de vizinhança de polinização) 54
- Tabela 7.** Resultados da análise de paternidade em um pequeno fragmento florestal de *Copaifera langsdorffii*. (N_{ep} : número efetivo de doadores de pólen; Θ : coeficiente de coancestria; $N_{e(v)}$: tamanho efetivo de variância populacional; m : número de árvores necessárias para a coleta de sementes) 56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Objetivos	16
1.2	Hipóteses	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Fragmentação florestal	18
2.2	Consequências genéticas da fragmentação florestal	19
2.3	Fenologia de florescimento e frutificação	21
2.4	Fluxo gênico via pólen	22
2.5	A espécie <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Material	28
3.1.1	<i>Local de estudo</i>	28
3.1.2	<i>Amostragem</i>	30
3.2	Métodos	32
3.2.1	<i>Extração e amplificação de DNA</i>	32
3.2.2	<i>Análise de microssatélites</i>	34
3.2.3	<i>Análises estatísticas</i>	36
3.2.3.1	<i>Análise da diversidade genética, endogamia e equilíbrio de Hardy-Weinberg</i>	36
3.2.3.2	<i>Sistema de reprodução</i>	37
3.2.3.3	<i>Taxa de sobrevivência</i>	37
3.2.3.4	<i>Análise do fluxo gênico e dispersão de pólen</i>	39
3.2.3.5	<i>Análise do coeficiente médio de coancestria e tamanho efetivo populacional</i>	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO PARCIAL	42
4.1	Diversidade genética e endogamia	42
4.2	Sistema de reprodução	44
4.2.1	<i>Taxa de cruzamento</i>	44
4.2.2	<i>Taxa de cruzamento entre parentes</i>	46
4.2.3	<i>Taxa de cruzamentos correlacionados</i>	46
4.3	Taxa de sobrevivência e associações com o índice de fixação e taxa de autofecundação	49
4.4	Análise do fluxo gênico e dispersão de pólen	50
4.4.1	<i>Fluxo gênico</i>	50
4.4.2	<i>Distância e padrões de dispersão de pólen</i>	52
4.4.3	<i>Vizinha efetiva de polinização</i>	55

4.5	Análise do coeficiente médio de coancestria e tamanho efetivo populacional por análise de paternidade	55
5	IMPLICAÇÕES DOS RESULTADOS PARA A CONSERVAÇÃO <i>EX SITU</i> E REFLORESTAMENTO AMBIENTAL	57
6	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

As florestas tropicais possuem uma grande diversidade de espécies arbóreas, as quais possuem diferentes sistemas reprodutivos, associados às complexas interações com agentes polinizadores e dispersores de sementes. A grande maioria das espécies arbóreas tropicais reproduz-se predominantemente por cruzamentos, e dependem de animais para a dispersão de pólen e/ou sementes.

O crescimento populacional acompanhado do crescimento da indústria provocou um aumento da demanda por recursos naturais. O uso abusivo de recursos e o descaso com o meio ambiente foram responsáveis pelo agravamento dos problemas ambientais. Atualmente tem-se consciência de que o ambiente não consegue se recuperar na mesma proporção em que é destruído, e que os recursos naturais são finitos. Distúrbios antropogênicos são responsáveis pela fragmentação das florestas nativas, deixando as populações de espécies arbóreas suscetíveis a efeitos deletérios da redução no fluxo gênico (BACLES; ENNOS 2008). As drásticas mudanças na geometria da paisagem tendem a afetar as interações entre plantas e animais e, conseqüentemente, a demografia e o recrutamento de plantas (HOWE, 1984; JANZEN, 1980). A derrubada da floresta pode afetar a abundância, diversidade e o comportamento de animais polinizadores que por sua vez, pode ter um impacto sobre a biologia reprodutiva da população das árvores remanescentes (CLOUTIER et al., 2007). Devido a isso, a precisão das previsões da resposta das florestas ao desmatamento e a fragmentação da população depende de um entendimento de quais modificações ocorrem no movimento de pólen e sementes como consequência das mudanças da paisagem.

O Estado de São Paulo localizado na região sudeste do Brasil é formado basicamente, pelos Biomas Mata Atlântica e Cerrado, e a importância destes ecossistemas foi recentemente reconhecida, com a inclusão de ambos na lista de *hotspots* (regiões biologicamente mais ricas e ameaçadas do planeta, nas quais as ações de conservação seriam mais urgentes). Atualmente, o Estado paulista corresponde à região mais industrializada e urbanizada do país, possuindo índices de desenvolvimento urbano e industrial superior aos países desenvolvidos da Europa Ocidental como: Espanha, Itália, Inglaterra, França e Alemanha. Entretanto, ao contrário destes países, o Estado de São Paulo não dispõe ainda de informações ambientais integradas, sistematizadas e de meios operacionais que o habilite a enfrentar os gravíssimos problemas de degradação ambiental decorrentes da expansão demográfica e urbana não planejada.

A Mata Atlântica é considerada como um dos 25 *hotspots* de biodiversidade no mundo (MYERS et al., 2000; SILVA; CASTELETI, 2005). Sua área ocupava grande parte do território nacional, sendo atualmente reduzida a apenas 4% de toda sua área original. Hoje, o bioma encontra-se intensamente fragmentado e a maior parte da população humana vive próxima a esses fragmentos e 70% do PIB está direta ou indiretamente relacionado com o bioma. Na Mata Atlântica a maior parte dos remanescentes florestais, especialmente em paisagens intensamente cultivadas, encontra-se na forma de pequenos fragmentos, altamente perturbados, isolados, pouco conhecidos e pouco protegidos (VIANA, 1995). Devido a sua extensão, o bioma encontra-se dividido em ecossistemas onde o que mais se destaca especificamente na região do noroeste paulista é a Floresta Latifoliada Semidecídua. Este ecossistema está entre os mais devastados dos últimos tempos consistindo em alta fragmentação. Tal processo vem reduzindo preocupantemente a biodiversidade dos fragmentos pelas introduções de novas matrizes devido ao avanço das fronteiras agrícolas. O estudo desse tipo de floresta é importante não somente pelo potencial econômico e ecológico das suas espécies, mas pelo grau de devastação que vem apresentando.

Cerca de 12% das florestas paulista (531 mil hectares) está pulverizado em pequenos fragmentos, muitas vezes com área inferior a 10 ha. Cada fragmento pode conter um banco de informações único, capaz de contribuir de forma relevante para a conservação da biodiversidade e a restauração de ecossistemas semelhantes. Apenas 35 % dos remanescentes florestais estão em unidades de conservação, a maioria com área superior a 100 ha, onde geralmente são conduzidos os estudos científicos. Os fragmentos florestais podem mostrar-se consistentes na recuperação de florestas no estado, sendo possível a criação de corredores ecológicos com a restauração das matas ciliares que margeiam os rios. Recuperando estas matas, seria possível interligar a maior parte dos fragmentos de São Paulo (ZORZETTO, 2010, p. 50-53).

Os estudos sobre os níveis e a distância de dispersão de pólen e estrutura genética espacial são úteis para determinar o número de árvores matrizes necessárias para a coleta de sementes para fins de reflorestamento ambiental (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007). Tais estudos têm sido eficientemente realizados com base em marcadores genéticos (BURCZYK et al., 2004; STREIFF et al., 1999). Entre os diferentes tipos de marcadores genéticos, os marcadores microssatélites são ideais para a quantificação dos padrões de dispersão de pólen em populações naturais de plantas (DAWSON et al., 1997) devido à sua herança codominante, alto polimorfismo, e conseqüentemente alta probabilidade de atribuição à exclusão de parentesco (LIAN et al., 2001).

1.1 Objetivos

O objetivo deste estudo foi investigar o sistema de reprodução, o fluxo, a distância e os padrões de dispersão de pólen em amostras de progênies de polinização aberta de *Copaifera langsdorffii* Desf., do Bosque Municipal de São José do Rio Preto, um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual localizado no norte do Estado de São Paulo. Mas especificamente objetivou-se:

1. Estimar os níveis de endogamia na fase de plântulas e árvores adultas para entender como é a sua dinâmica entre gerações em uma pequena população fragmentada;
2. Determinar as taxas de cruzamento em árvores do fragmento florestal;
3. Determinar a taxa de imigração de pólen (fluxo gênico) no fragmento;
4. Determinar a distância e os padrões de dispersão de pólen dentro do fragmento;
5. Determinar a coancestria e o tamanho efetivo dentro das progênies e com base nestas informações estimar o número de árvores matrizes necessárias para a coleta de sementes, para obter amostras de sementes com tamanho efetivo de 150 para conservação genética e recuperação ambiental.

1.2 Hipóteses

As três principais hipóteses testadas neste estudo foram:

1. Em vista do pequeno tamanho da população reprodutiva (112 indivíduos) e variação na fenologia de florescimento das árvores, baixa taxa realizada de imigração de pólen e presença de estrutura genética espacial intrapopulacional (SEBBENN et al., 2011), possivelmente uma grande parte dos cruzamentos são correlacionados e endogâmicos. Portanto, a coancestria entre plantas dentro de progênies deve ser substancialmente maior e o tamanho efetivo substancialmente menor do que o esperado em populações panmíticas ($\Theta > 0,125$, $N_e = 4$).

2. Em relação à dinâmica da endogamia entre gerações, como na população estudada existe estrutura genética espacial e a espécie apresenta sistema misto de reprodução, com predomínio de cruzamentos, acredita-se que os níveis de endogamia sejam maiores na fase de sementes do que na fase adulta ou juvenil;

3. Considerando o fato de que a população encontra-se isolada 1,2 km do indivíduo mais próximo e prévios resultados obtidos para regenerantes que mostraram baixa taxa de imigração de pólen e um padrão de dispersão entre vizinhos próximos (SEBBENN et al., 2011), acredita-se que o fragmento não esteja reprodutivamente isolado, mas que a maior frequência dos cruzamentos ocorra entre vizinhos próximos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fragmentação florestal

Os ecossistemas florestais são responsáveis pela manutenção dos mananciais hídricos, na estabilização do clima no planeta por absorver o dióxido de carbono da atmosfera (CO_2), além de servir de abrigo para um grande número de espécies de plantas e animais, incluindo muitas espécies ameaçadas de extinção. Grandes áreas contínuas de florestas tropicais estão rapidamente se tornando fragmentadas em resultado de atividades humanas, levando a uma crescente necessidade de informação sobre o grau de isolamento reprodutivo das populações, sistema de reprodução e respostas genéticas de espécies arbóreas à perturbação (NASON; HAMRICK, 1997).

A degradação e a fragmentação dos habitats florestais em pequenos remanescentes isolados representam uma importante ameaça em longo prazo para a biodiversidade global. A fragmentação de áreas contínuas de florestas em fragmentos florestais reduz o tamanho efetivo das populações e isola indivíduos na paisagem, especialmente das espécies que ocorrem em baixa densidade populacional. Consequentemente, isto pode provocar alterações no sistema de cruzamento das espécies, como o aumento do grau de parentesco entre indivíduos e a endogamia. O processo contínuo de fragmentação pode resultar em diminuição no tamanho médio dos fragmentos, aumento da distância entre eles, aumento do efeito de borda (TOWNSEND et al., 2006), e perda de espécies do interior da floresta que não podem sobreviver em habitats limitados (DAJOZ, 2006). Uma das principais consequências da fragmentação é a extinção de populações e espécies, um processo lento e natural que deve manter equilíbrio em relação ao número de especiações, mutações e modificações das frequências dos alelos que geram novas espécies. A exploração excessiva do meio ambiente desencadeia a diminuição da biodiversidade, uma vez que a taxa de extinção se torna maior que a especiação. A atual perda de espécies é algo sem precedentes e pode ser irreversível (PRIMACK; RODRIGUES, 2002).

Uma redução intensa do tamanho da população reprodutiva tem o potencial para reduzir os níveis de diversidade genética e, consequentemente, afetar o futuro potencial adaptativo de uma espécie (GLAUBITZ et al., 2003; LOWE et al., 2005; RAJORA et al., 2000). Além disso, a redução do número de árvores reprodutivas pode afetar o movimento do

polinizador e, portanto, a capacidade de dispersão do pólen, que pode causar um aumento na taxa de autofecundação e cruzamentos correlacionados. Em alguns casos, as árvores podem tornar-se espacialmente e geneticamente isoladas, possivelmente levando à extinção local (NASON; HAMRICK, 1997). Contudo, muitas espécies de árvores podem ser tamponadas dos efeitos negativos da fragmentação de habitat, devido à longevidade individual, alta densidade populacional, alta diversidade genética intrapopulacional e pelo seu potencial de fluxo de pólen a longa distância, tornando-as, especialmente resistente à extinção e perda de diversidade genética durante mudanças ambientais (HAMRICK, 2004; JUMP; PEÑUELAS, 2006; KETTLE et al., 2007).

Detectar os efeitos genéticos da degradação do habitat e a fragmentação florestal de árvores de longa vida é complicado pelo fato de que, em muitos casos, as árvores adultas podem ter se estabelecido antes da degradação. Isso é muitas vezes constatado em regiões tropicais onde a degradação ocorreu mais aceleradamente nos últimos 100 a 200 anos (LOWE et al., 2005).

Quantificar o impacto da degradação do habitat em remanescentes florestais não só pode ajudar a avaliar as consequências genéticas e ecológicas destas mudanças, mas também poderá ajudar a verificar o valor da conservação dos fragmentos remanescentes, pela estimativa das futuras repercussões do desmatamento das florestas tropicais, além de permitir formular estratégias de conservação eficazes e sustentáveis para a gestão dos recursos genéticos de espécies que habitam paisagens degradadas (LEMES et al., 2003; LIRA et al., 2003; NEWTON et al., 1999; WHITE et al., 1999).

2.2 Consequências genéticas da fragmentação florestal

As consequências genéticas da fragmentação são alterações nos níveis de fluxo gênico, refletindo diretamente na taxa de cruzamento por alterar o tamanho das populações das espécies, ou indiretamente, por influenciar a abundância ou o comportamento dos agentes polinizadores (KARRON et al., 1995). Estas consequências tendem a aumentar a frequência de cruzamentos correlacionados e endogâmicos nas populações remanescentes. O aumento da endogamia pode desencadear a depressão endogâmica, sendo esta mais severa em espécies predominantemente de cruzamento, as quais geralmente mantêm altos níveis de carga genética (NASON; HAMRICK, 1997).

A fragmentação pode também causar a perda de genes específicos, alterações na frequência gênica e induzir mudanças nos padrões de diversidade genética (tais como a heterozigosidade), sistema de cruzamento, parentesco, fluxo gênico e tamanho efetivo da população (CLOUTIER et al., 2007; HAWLEY et al., 2005; JENNINGS et al., 2001; LOWE et al., 2005). A teoria prevê que a fragmentação do habitat deverá conduzir à ruptura de sistemas de cruzamento de plantas, levando ao aumento da endogamia e diferenciação entre populações e a erosão da variabilidade genética dentro das populações, além de potencializar o efeito de borda, levando a extinções e invasão de outras espécies. No curto prazo, um aumento da endogamia pode resultar em uma menor aptidão individual e reduzir a viabilidade da população, aumentando assim o risco de extinção das populações individuais. Em longo prazo, a redução da diversidade genética pode limitar o potencial evolutivo da espécie para responder a alterações ambientais (JUMP; PEÑUELAS, 2006).

Os principais fatores que afetam a dinâmica de fragmentos florestais são: tamanho, forma, grau de isolamento, tipo de vizinhança e histórico de perturbações (VIANA et al., 1992). Esses fatores apresentam relações com fenômenos biológicos que afetam a natalidade e a mortalidade de plantas como, por exemplo, o efeito de borda, a deriva genética e as interações entre plantas e animais. Se o movimento dos vetores de polinização é restringido pela fragmentação, os fragmentos tornam-se unidades geneticamente e demograficamente isoladas de pequeno tamanho efetivo populacional. Isso causa o que se conhece por gargalo genético e pode por em risco a sobrevivência das populações de diversos organismos. No curto prazo, o aumento da endogamia e uma perda de heterozigosidade podem reduzir a aptidão individual e a viabilidade da população (NASON; HAMRICK, 1997). Em longo prazo, a deriva genética pode ter o mesmo efeito, embora esta dependerá do número de gerações que se passarem após o gargalo genético e se o tamanho da população reprodutiva é pequena (NEI et al., 1975), de modo que populações isoladas podem sofrer significativas reduções no número de alelos, frequência dos alelos e na variação genética quantitativa (FALCONER, 1996; LACY, 1987; LANDE; BARROWCLOUGH, 1987).

O efeito de borda é detectado quando uma pequena mata passa a estar cercada por áreas abertas, interferindo na abundância relativa e na composição de espécies na parte marginal do fragmento (FERNANDEZ, 2000). Quanto mais irregular e menor for o perímetro do fragmento, maior será a área de contato com a matriz (conjunto de unidade não-habitat para uma determinada comunidade ou espécie), e conseqüentemente menor será a área livre do efeito de borda (MENDES, 2008).

Estudos da diversidade genética, fluxo gênico contemporâneo, sistema de reprodução e distribuição espacial de genótipos em populações fragmentadas são fundamentais para entendimento detalhado das consequências desses processos sobre as populações remanescentes, permitindo o delineamento de estratégias para a conservação *in situ* e *ex situ*, bem como para a coleta de sementes em árvores matrizes para fins de recuperação ambiental (SEBBENN et al., 2011). O estudo detalhado do fluxo gênico contemporâneo, distância e padrões de dispersão de pólen, sistema de reprodução, estrutura genética espacial intrapopulacional e dinâmica de endogamia entre gerações, só é possível com a amostragem, mapeamento e genotipagem de todas as árvores reprodutivas, regenerantes e sementes de polinização aberta coletadas dentro de uma área delimitada, como uma parcela ou um fragmento espacialmente isolado.

2.3 Fenologia de florescimento e frutificação

Fenologia é definida como estudo da ocorrência de eventos biológicos, a influência dos fatores bióticos ou abióticos nestes eventos e as relações entre as fenofases (floração, floração em botão, frutos, frutos verdes, frutos maduros, queda das folhas e brotação) de espécies diferentes ou de uma única espécie (LIETH, 1974; MANTOVANI et al., 2003; MORELLATO, 1995), que contribuem para o entendimento dos padrões reprodutivos e vegetativos de plantas e animais que delas dependem.

O período reprodutivo é uma fase de grande importância para a dinâmica das populações e para a própria sobrevivência das espécies (MANTOVANI et al., 2003). Sendo assim, o desenvolvimento de pesquisas básicas sobre os processos ecológicos envolvidos na reprodução das plantas é fundamental para uma melhor compreensão da diversidade estrutural e funcional do bioma onde elas estão inseridas e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de ferramentas úteis para a conservação e manejo destes sistemas.

O estudo dos padrões fenológicos podem variar dentro de uma espécie, se avaliados em diferentes ecossistemas florestais (NEWSTROM et al., 1994), além do que permitem avaliar a disponibilidade de recursos ao longo do ano e o conhecimento da floração e frutificação, que pode variar entre populações, entre indivíduos e entre anos (STEPHENSON, 1981). Além disso, o estudo dos eventos fenológicos permite prever períodos de reprodução das plantas, seus ciclos de crescimento e outras características de grande importância no

manejo florestal e em programas de conservação de recursos genéticos (FOURNIER, 1976; MANTOVANI et al., 2003; MORELLATO, 1995).

As variações fenológicas podem ser influenciadas por vários fatores, como exposição à luz, dano foliar, estresse hídrico e aborto de flores (MANTOVANI et al., 2003). Em *Copaifera langsdorffii*, altas temperaturas e índices pluviométricos têm sido detectados como algumas das características favoráveis para o florescimento durante a estação chuvosa (MORELLATO, 1992). Segundo a classificação de Newstrom et al. (1994), o padrão de florescimento apresentado em *Copaifera langsdorffii*, pode ser considerado como regular, pois a floração sempre ocorre no mesmo período do ano (estação chuvosa) e supra-anual, porque ocorreu somente em alguns anos.

O florescimento sincronizado favorece a atração de polinizadores (MARQUIS, 1988) e deve ser importante para a ocorrência de polinização cruzada entre indivíduos de *Copaifera langsdorffii*.

A espécie *C. langsdorffii* como é polinizada por abelhas que fazem visitas em grandes grupos, o fato reforça a relação da curta duração das flores, comum em plantas neotropicais (CUNNINGHAM, 1994), e a alta probabilidade de serem polinizadas no mesmo dia.

O padrão supra-anual de frutificação parece ser comum para o gênero *Copaifera*, conforme detectado por DIAS e OLIVEIRA-FILHO (1996). Segundo Tapper (1992), a frequência irregular de frutificação é considerada uma estratégia adaptativa da espécie para reduzir a predação de sementes através da saciação dos predadores.

2.4 Fluxo gênico via pólen

A conectividade genética entre populações de espécies arbóreas é dada pelo fluxo gênico através de pólen e sementes (ENNOS, 1994). A dispersão do pólen é um componente importante de fluxo gênico em populações de plantas, devido as suas dimensões e potencial para viajar geralmente a maiores distâncias do que as sementes. O potencial de transporte à longa distância dos gametas masculinos influencia grandemente os processos genéticos, que tem por sua vez, implicações evolutivas, tais como "o isolamento pela distância" das populações contínuas e a troca gênica entre populações espacialmente isoladas (CRAWFORD, 1984; ENNOS, 1994; WRIGHT, 1946). Quando restrito, o fluxo gênico define a variação das populações em resposta à seleção natural local ou à deriva genética,

enquanto que o fluxo gênico por longas distâncias promove a homogeneidade genética entre as populações da espécie (ELLSTRAND, 1992; SLATKIN, 1985).

O fluxo gênico é fundamental na formação das populações e determinação da escala espacial e temporal demográfica que as populações respondem à seleção. O modo de dispersão de pólen e sementes é um fator importante, determinando onde as espécies se mantêm e como elas estendem seus limites geográficos. Baixos níveis de imigração de pólen e curta distância de dispersão de pólen e de sementes, associado à estrutura genética espacial em povoamentos florestais, pode produzir heterogeneidade no conjunto de pólen, cruzamentos entre parentes e endogamia. Conseqüentemente, a diversidade genética e o tamanho efetivo dentro de progênies serão reduzidos (SEBBENN, 2002). A deriva genética causa mudanças estocásticas em direções imprevisíveis, alelos são perdidos e aumenta a endogamia e a coancestria dentro das populações (LINDGREN, 1996).

Muitas espécies vegetais em que o fluxo gênico depende de insetos para o transporte de pólen, têm o comportamento dos polinizadores como determinante de quão longe o pólen é transportado (AHMED et al., 2009). A polinização determinará os padrões do tamanho da vizinhança reprodutiva de uma planta, a conectividade das populações e os impactos da fragmentação do habitat (ASHLEY, 2010). Collevatti et al. (2010) constataram que a atividade dos polinizadores pode variar muito entre as árvores-matrizes, o que pode ser evidenciado pela ampla variação no número de doadores de pólen entre árvores-matrizes e o baixo número efetivo de doadores de pólen, em relação ao número de indivíduos reprodutivos na população.

O fluxo de genes é uma grande força evolutiva, por homogeneizar as frequências alélicas entre as populações através da troca de genes, e moldar o tamanho efetivo da vizinhança reprodutiva (WRIGHT, 1943). Tradicionalmente, os métodos de referência para estimar o fluxo de genes a partir de dados genéticos dependem de medidas de diferenciação genética entre as populações (WRIGHT, 1951) ou entre indivíduos na população (ROUSSET, 2000). Mas recentemente, estimativas contemporâneas de fluxo de genes tornaram-se possíveis através de análise de parentesco (maternidade e paternidade) com base em dados de marcadores genéticos altamente polimórficos, neutros e co-dominantes, como os microssatélites (ASHLEY, 2010).

Dentro de populações contínuas, o fluxo gênico é estimado com base em análises de parentesco (MEAGHER, 1986; MORGAN; CONNER, 2001). Para isso, amostras de mudas ou sementes de polinização aberta e todos adultos reprodutivos existentes dentro de uma área estabelecida são genotipados para marcadores altamente polimórficos para estimar a distância

e os padrões de dispersão das sementes e pólen (MEAGHER, 1986). Um dos principais problemas nestas análises é a distinção entre parentais maternos e paternos dos filhos, em caso de espécies monoicas. Uma solução é a genotipagem de tecidos maternalmente herdado nas sementes dispersas (JONES et al., 2005; JORDANO et al., 2007). Ao lidar com plântulas estabelecidas, sempre que os tecidos não são puramente de herança materna ou paterna, a média efetiva da distância de dispersão pode ser estimada diretamente a partir da distância entre pais-filhos, utilizando modelos, como o modelo de vizinhança (BURCZYK et al., 2006). Essas abordagens têm ganhado uma grande aceitação entre os geneticistas de populações e ecologistas, pois permitem caracterizar o primeiro processo de dispersão de sementes e de pólen (BURCZYK et al., 2006; MORGAN; CONNER, 2001), e também, investigar fatores ecológicos que podem influenciar esses padrões, como características fenotípicas parentais (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2006), o comportamento de dispersores de sementes (JORDANO et al., 2007), ou a heterogeneidade espacial do ambiente (JONES et al., 2005). As estimativas de fluxo gênico contemporâneo, com base nos genótipos individuais e atribuição de parentesco e baseadas na estrutura genética espacial (SGS) são abordagens complementares para avaliar as respectivas importâncias do fluxo gênico e deriva genética. A suposição para estimativas históricas de dispersão a partir da análise de SGS, é que a dispersão apresenta um padrão de isolamento por distância, ou seja, que em populações naturais de espécies arbóreas, quando à dispersão de sementes e pólen é limitada, tendem gerar uma estrutura genética espacial (SGS) dentro das populações (CARVER et al., 2005). A SGS de uma população é determinada pela interação de fatores como a densidade de adultos, o sistema de reprodução, a história de colonização, a seleção natural e os mecanismos e padrões espaciais de dispersão de genes (VEKEMANS; HARDY, 2004; JONES et al., 2006).

Estudos genéticos com árvores tropicais têm revelado dispersão de pólen e sementes à longas distâncias em terrenos fragmentados, através de floresta remanescente, sugerindo que árvores espacialmente isoladas podem formar ligações vitais entre populações (ALDRICH; HAMRICK, 1998).

A dispersão a longas distâncias depende principalmente da resposta comportamental dos insetos polinizadores à fragmentação florestal. Alterações nas assembleias de polinizadores foram constatadas com a marcação e recaptura de abelhas em remanescentes, mostrando que abelhas foram capazes de percorrer distâncias de até 4 km (WHITE et al., 2002). Insetos polinizadores têm o potencial de viajar e dispersar o pólen a longas distâncias como observado em *Swietenia humilis* (até 4,5 km, WHITE et al., 2002), *Dicorynia guianensis* (até 4,7 km, LATOUCHE-HALLE et al., 2004), *Eucalyptus wandoo* (até 1 km,

BYRNE et al., 2008), *Bagassa guianensis* (até 961 m, SILVA et al.; 2008), *Symphonia globulífera* (963 m, CARNEIRO et al., 2009), *Sorbus domestica* (até 16 km, KAMM et al., 2009) e *Tabebuia aurea* (1.651 m, BRAGA; COLLEVATTI, 2010), nas quais foi detectado distâncias de dispersão de pólen superiores a 800 m. Longas distância de dispersão de pólen em espécies arbóreas polinizadas por insetos também foram encontradas em *Platypodium elegans* (>750 m, HAMRICK; MURAWSKI, 1990) e *Eurycorymbus cavaleriei* (667 m, WANG et al., 2007).

Embora estes estudos tem constatado que a dispersão de pólen podem atingir grandes distâncias, a frequência destes eventos é baixa e a maior parte dos cruzamentos ocorrem entre os vizinhos mais próximos em *Pithecellobium elegans* (350 m, CHASE et al., 1996), *Glyricidia sepium* (275 m, DAWSON et al., 1997), *Dinizia excelsa* (212 m, DICK et al., 2003), *Eurycorymbus cavaleriei* (200 m, WANG et al., 2007), *Bagassa guianensis* (entre 308 e 961 m, SILVA et al., 2008) e *Tabebuia aurea* (entre 4,0 e 6,0 m, BRAGA; COLLEVATTI, 2010).

2.5 A espécie *Copaifera langsdorffii* Desf.

Copaifera langsdorffii Desf. é uma espécie arbórea da família LEGUMINOSAE, subfamília CAESALPINIOIDEAE, conhecida popularmente por copaíba, pau-d.óleo, podói, cupaúba e cupiúva (CORRÊA, 1984). O gênero *Copaifera* abrange 72 espécies (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002), sendo dezessete (DWYER, 1951) endêmicas do Brasil. A *Copaifera langsdorffii* Desf. ocorre nos estados de MG, GO, MS, SP e PR, é uma planta decídua ou semidecídua, hermafrodita, predominantemente alógama e encontrada principalmente na floresta latifoliada da bacia do Paraná. Ocorre, tanto em floresta primária como em formações secundárias, sendo característica das formações de transição do cerrado para Floresta Estacional Semidecidual (LORENZI, 2000).

A espécie é utilizada para produção de madeira e óleo, além da arborização urbana e recuperação de áreas degradadas (LORENZI, 1992). Quimicamente, o óleo-resina de copaíba pode ser definido como uma solução de ácidos diterpênicos em um óleo essencial constituído majoritariamente por sesquiterpenos (CASCON; GILBERT, 2000). Do ponto de vista biológico, é um produto de excreção ou desintoxicação do organismo vegetal, e funciona

como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias (ALENCAR, 1982; LANGENHEIM, 2003; PONTES et al., 2003). O óleo-resina de copaíba, desde o início da colonização do Brasil, continua sendo amplamente utilizado na medicina popular como cicatrizante, anti-inflamatório (RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2006) das vias urinárias, em infecções pulmonares (tosses, bronquites, gripes e resfriados) (PAIVA et al.; 1998), anti-séptico, antitumoral (OHSAKI et al., 1994), como agente para tratar doenças de pele e úlceras (ALENCAR, 1982).

Segundo Dwyer (1951), pode-se caracterizar o gênero *Copaifera* como árvores com casca aromática; folhas compostas com 1-12 pares de folíolos; inflorescências paniculadas com flores pequenas, numerosas e sésseis, dispostas em espigas; quatro sépalas; geralmente dez estames; ovários estipilados; dois óvulos; fruto com duas válvulas, geralmente lisas, com endocarpo subfibroso; sementes solitárias, brilhosas e cobertas com arilo colorido. As copaibeiras são árvores de crescimento lento, alcançam de 25 a 40 m de altura, podendo viver até 400 anos; são polinizadas por abelhas *Apis melífera* e *Trigona* sp (CARVALHO, 2003) e as maiores responsáveis pela dispersão das sementes são aves como o tucanuçu (*Ramphastos toco*), a galha-do-campo (*Cyanocorax cristatellus*) e o sabiá, que engolem o arilo e regurgitam a semente (CARVALHO, 1994). O tronco é áspero, mede de 0,4 a 4m de diâmetro e apresenta coloração escura. As folhas são alternadas, pecioladas e penuladas (Figura 1). Os frutos contêm uma semente ovóide envolvida por um arilo abundante e colorido (CORRÊA, 1984; VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002). As sementes maduras são exalbuminosas, ricas em amilóide, proteínas e óleos em abundância, armazenados nos cotilédones (CRESTANA; BELTRATI, 1988). O florescimento e a frutificação da copaíba, quando em plantios, ocorrem a partir dos cinco anos de idade, entre os meses de outubro e julho ocorre a floração e entre junho e outubro a frutificação, com variações dentro destes intervalos, em função da região e do clima, podendo até em algumas regiões ocorrer à ausência de florescimento anual (CARVALHO, 1994; SANTOS, 1979).

De acordo com Carvalho (1994), a espécie apresenta dormência ocasional, promovida pela presença de cumarina no tegumento. Apresenta um sistema misto de reprodução, mas com predomínio de cruzamentos (OLIVEIRA et al., 2002; SEBBENN et al., 2011). Do ponto de vista da tecnologia de sementes, a maior dificuldade encontrada na espécie é manter as sementes viáveis durante o armazenamento, uma vez que estas apresentam longevidade variando de dois meses até quatro anos (CARVALHO, 1994; DAVIDE et al., 1995; GONZÁLES; TORRES, 2003).

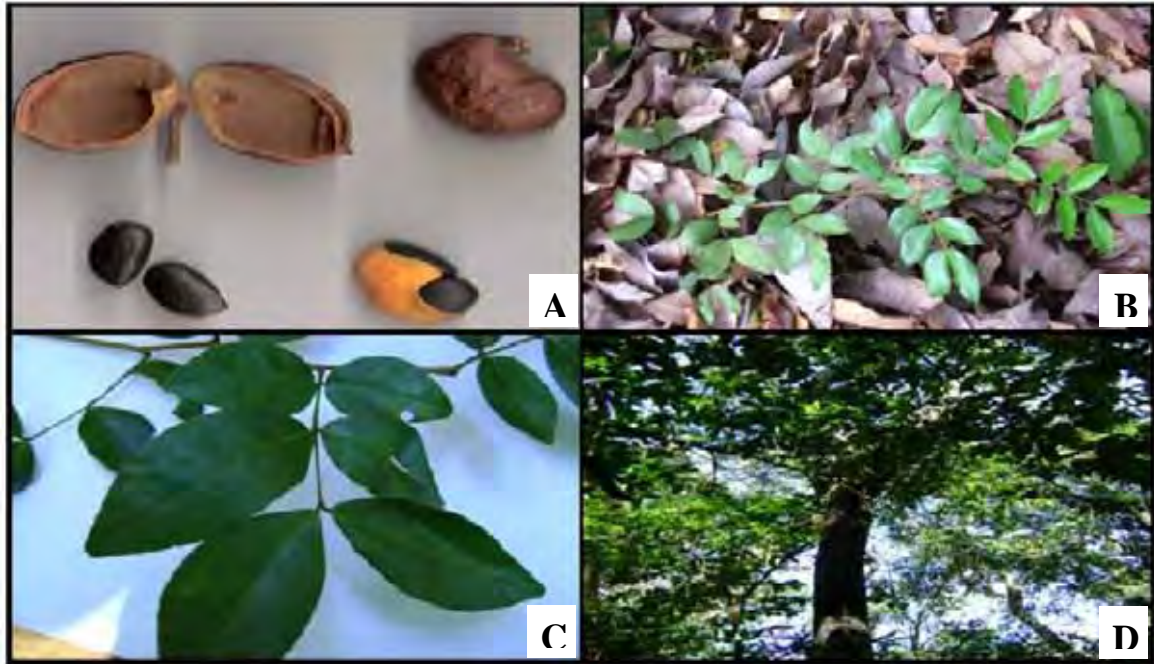


Figura 1. Detalhes da espécie *Copaifera langsdorffii*. A – Sementes (Foto: [Aconchego-olinda.blogspot.com](http://aconchego-olinda.blogspot.com)); B - Plântula; C - Folha; D - Fuste. Fotos: Ricardo de Oliveira Manoel

No cerrado brasileiro, um tipo de vegetação de savana, a *C. langsdorffii* é uma árvore com cerca de 15 m de altura, 50 cm de diâmetro, copa densa e tronco avermelhado (PLOWDEN, 2003; VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002). A espécie é uma árvore importante no Brasil por causa do valor econômico de sua madeira e do óleo extraído de seu tronco. No entanto, a maior parte da Mata Atlântica, habitat natural da espécie no Brasil foi destruído e apenas 11,4% a 16% da área original permanece (RIBEIRO et al., 2009), e atualmente a espécie é encontrada apenas em pequenos e isolados fragmentos florestais ou em árvores isoladas em pastagens ao longo de rodovias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Local de estudo

O estudo foi realizado no Bosque Municipal de São José do Rio Preto (20° 46 '44,14 "S, 49° 21' 17,70"W), no município de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, sudeste do Brasil (Figura 2). O clima da região é tropical, com inverno seco e verão úmido. A altitude é de 489 m e a precipitação média mensal varia de 16 mm (julho) e 241 mm (janeiro). A temperatura média anual é de 25,3 °C, com média de 18,9 °C no mês mais frio (julho) e de 27,8°C para o mês mais quente (janeiro). A vegetação da região é caracterizada como Floresta Atlântica Estacional Semidecidual. O Parque público de São José do Rio Preto é pequeno de 4,8 ha, com uma alta diversidade de espécies de árvores (cerca de 70, STRANGHETTI et al., não publicado). Este fragmento é um remanescente da floresta contínua semi-decídua. A fragmentação da área para fins agrícolas ocorreu entre 60-80 anos atrás. A população de *C. langsdorffii* no fragmento florestal está geograficamente isolada e a árvore da mesma espécie mais próxima está à 1,2 km de distância. O parque é cercado por uma cerca de arame de 3 m de altura, pela cidade e plantações de cana-de-açúcar (Figura 2). No passado, o fragmento também foi explorado por corte seletivo. O fragmento contém 112 árvores adultas de *C. langsdorffii* (23,3 árvores ha) com DAP variando de 15 a 93 cm (média 40,2 cm) e idade, provavelmente, variando de 22 a 140 anos (Figura 3). Muitas dessas árvores são de estágios pré-fragmentação.



Figura 2. Imagem aérea de parte do município de São José do Rio Preto, onde estão localizadas as árvores de *Copaifera langsdorffii* amostradas no fragmento florestal. **Fonte:** Google Earth, 01 novembro 2010.



Figura 3. Distribuição espacial dos genótipos adultos de *Copaifera langsdorffii* no fragmento. **Fonte:** Google Earth, 07 dezembro 2010.

3.1.2 Amostragem

Para os estudos foram medidos para o diâmetro a altura do peito (DAP), amostradas e mapeadas usando um GPS III[®] (Garmin, USA) todas as 112 árvores adultas reprodutivas ocorrendo na área (Figuras 3 e 4). Tecidos foliares e cambio do tronco das maiores árvores foram amostradas para as análises genéticas. Também foram coletadas sementes de polinização aberta de 15 árvores matrizes do fragmento florestal (22 a 25 sementes por matriz). Vinte sementes também foram coletadas da árvore matriz encontrada mais próxima do fragmento (Figura 5). A amostra das sementes de polinização aberta do fragmento florestal permite determinar a taxa de imigração contemporânea de pólen.

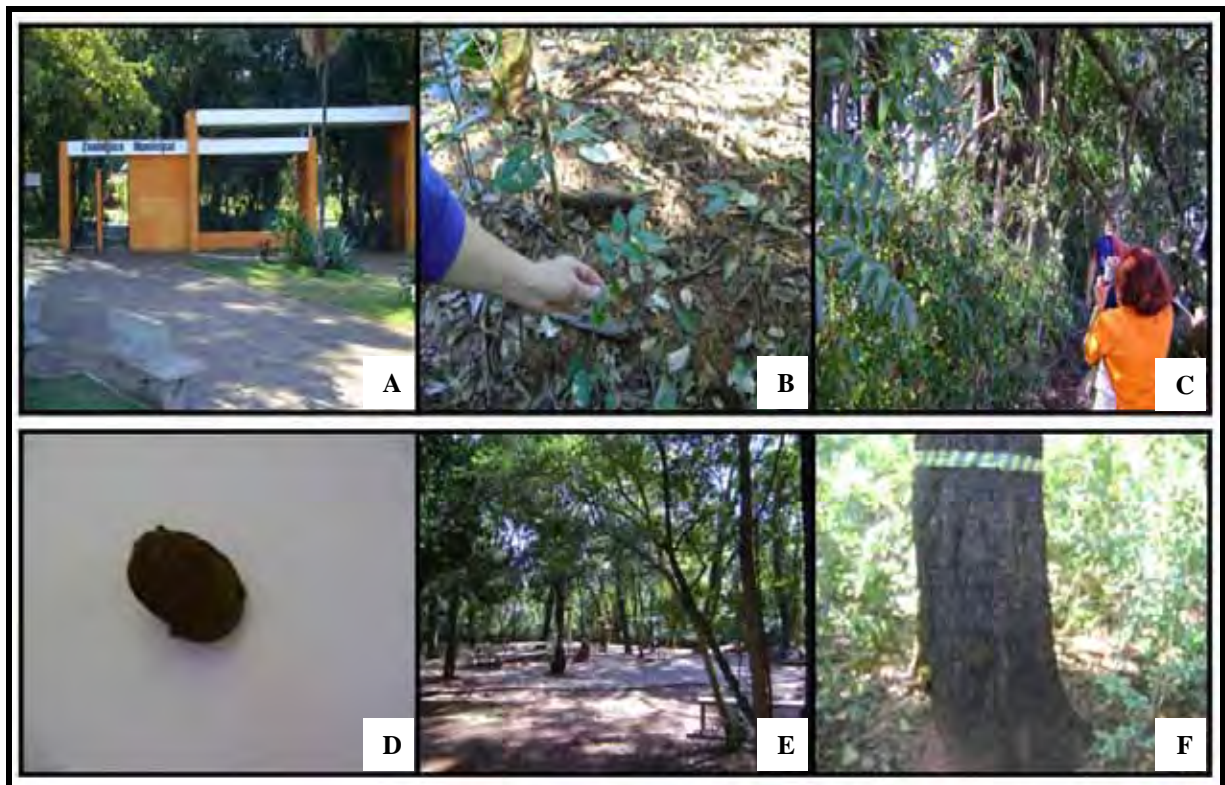


Figura 4. Indivíduos de *Copaifera langsdorffii* amostrados no fragmento florestal. A - Vista Central do Bosque Municipal; B - Renegerantes; C - Coleta de material foliar com o auxílio de podão; D - Coleta de sementes no Bosque; E - Vista do interior do Bosque; F - Marcação e georreferenciamento dos indivíduos amostrados no Bosque. Fotos: Ricardo de Oliveira Manoel.



Figura 5. Localização da árvore de *Copaifera langsdorffii* distante a 1,2 km do fragmento florestal. **Fonte:** Google Earth 21, janeiro 2011

3.2 Métodos

3.2.1 Extração e amplificação de DNA

A extração de DNA das plantas adultas de *C. langsdorffii* foi efetuada com base na metodologia de Doyle e Doyle (1990) modificada por Alzate-Marin et al., (2005), para a espécie *Copaifera langsdorffii*. Após a extração, o DNA foi quantificado em gel de agarose a 1% (Figura 6), mediante comparações visuais com concentrações conhecidas de DNA de fago λ , corado com gel red. Uma vez quantificado o DNA, procedeu-se amplificação de regiões de microssatélites através de reações da polimerase em cadeia (PCR) utilizando condições semelhantes às descritas por Ciampi et al. (2000). As amplificações foram efetuadas usando-se os conjuntos de iniciadores (*primers*) discriminados na Tabela 1. A reação de amplificação de 10 μ l foi realizada utilizando-se 4 ng de DNA genômico, 0,2 mM de cada dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,9, 50 mM de KCl, 0,25 μ M de cada um dos oito *primers* microssatélites 3' e 5' (*forward* e *reverse*) e 1,25 unidades de *Taq* polimerase e água MiliQ ultra puraestéril até completar o volume total da reação.

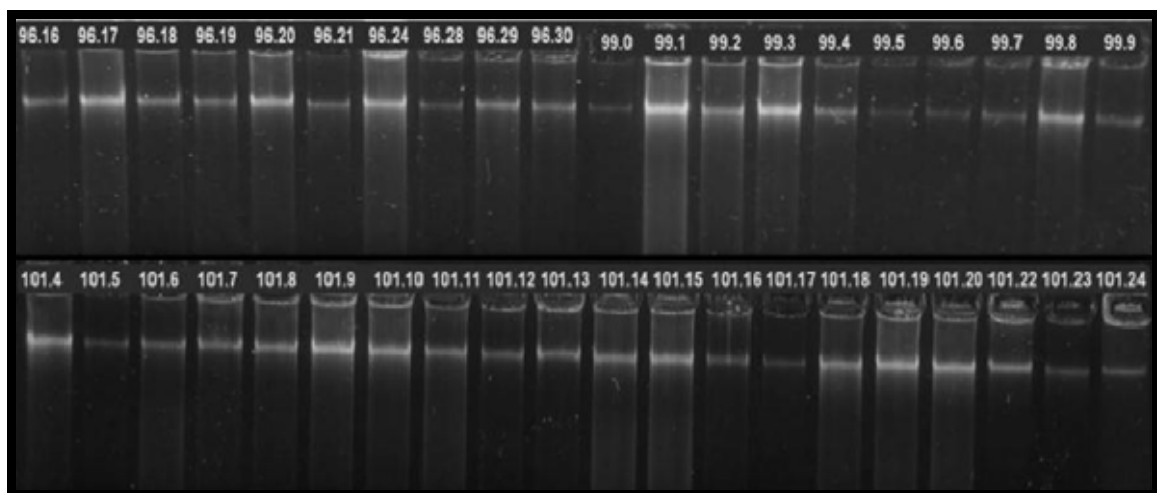


Figura 6. Quantificação de DNA em gel de agarose à 1% de amostras das *seedlings* da população do fragmento florestal.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador marca Eppendorf, programado nas seguintes condições: 5 minutos a 95°C, seguidos por uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 minuto, uma etapa de ligação do *primer* SSR ao DNA molde a 50-68°C por 1 minuto (dependendo da temperatura de anelamento do *primer*, conforme a Tabela 1), e uma etapa de extensão a 72°C, por 1 minuto. Depois de 29 ciclos efetuou-se uma última etapa de extensão a 72°C, por 7 minutos (GONELA, 2005). Os locos amplificados foram separados sob condições desnaturantes em gel contendo 5% de poliacrilamida (8M), uréia (1 kg de uréia tem PM=60,06, e utilizou 420g dessa uréia) e 10 X TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) (Figuras 7 e 8). A visualização dos produtos de amplificação foi feita com nitrato de prata (20%) segundo protocolo de Sanguinetti et al. (1994). Estimativas dos tamanhos dos produtos de amplificação em pares de bases foram feitas comparando-se com escalas alélicas de 10 pares de bases. Fragmentos de diferentes mobilidades foram considerados alelos diferentes. As imagens dos géis foram digitalizadas através de um *scanner* e armazenadas em arquivos.

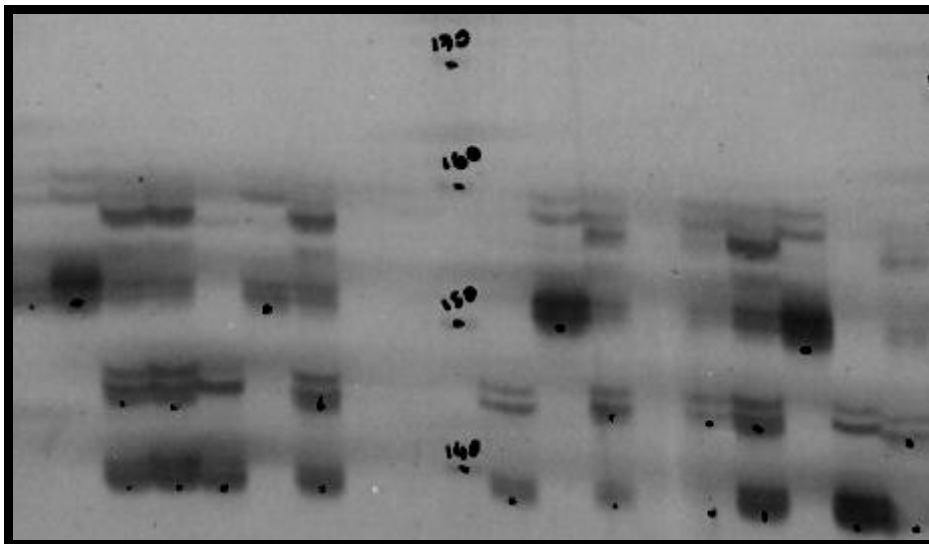


Figura 7. Gel de poliacrilamida 5% contendo amostras de PCR das *seedlings* procedentes da árvore isolada com o *primer* CL 06

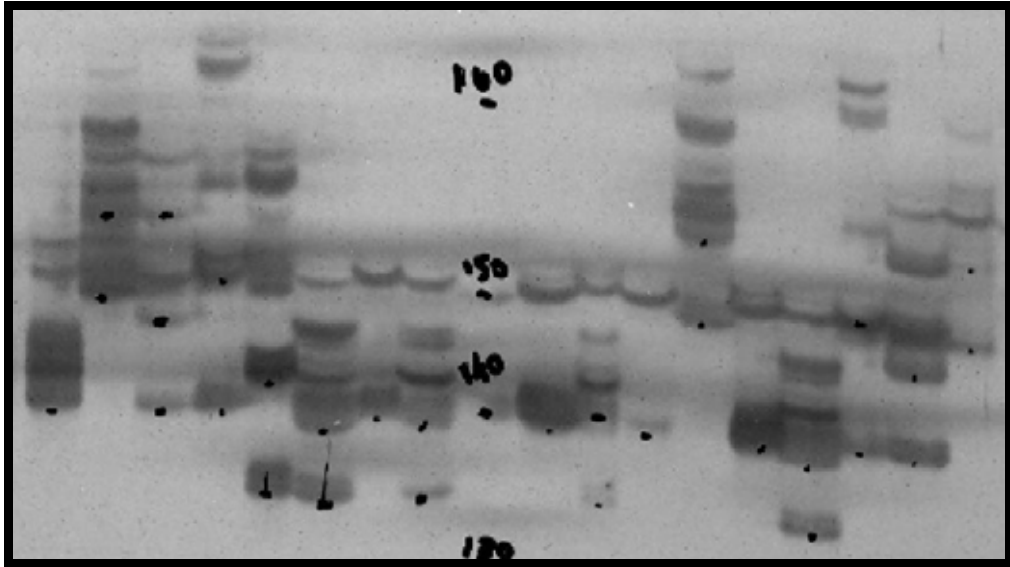


Figura 8. Gel de poliacrilamida 5% contendo amostras de PCR das *seedlings* da população do fragmento florestal com o *primer* CL 06

3.2.2 Análise de microssatélites

Para os estudos genéticos no presente projeto foi coletado material vegetal de 112 indivíduos adultos de *C. langsdorffii*, sendo que destes, 110 indivíduos são originários de tecido foliar e dois de câmbio. Foram genotipadas as 112 árvores adultas, destas 15 árvores matrizes e 371 progênies provenientes do fragmento florestal. Também foi genotipada a árvore-matriz isolada e as 20 progênies provenientes desta árvore espacialmente isolada. O material vegetal foi submetido à extração de DNA genômico total e a amplificação através de reações em cadeia da polimerase (PCR) para as regiões de microssatélites utilizando-se oito pares de *primers* microssatélites. Os oito locos microssatélites utilizados foram CL01, CL02, CL06, CL20, CL27, CL32, CL34 e CL37, todos são dinucleotídeos simples.

Tabela 1. Sequências dos *primers* SSR descritos por Ciampi et al. (2000) para *Copaifera langsdorffii*.

Loco	Elementos repetidos	Sequências do primer 5' - 3'	Temperatura Anelamento (°C)	Produto PCR (pb)
CL01	(AG) ₂₄	F AGACTCCATTCTTCCACAGC R CTGTCTTCTCTCTGCAACCA	58	152 – 240
CL02	(TC) ₂₅	F CCTCGATCCTCCTTGTGTTC R TCAGTTCGGATAGCGATGC	68/58/50*	236 – 312
CL06	(TC) ₁₄	F GAGCGTTGCAAGGAATTTCT R CGAAACTTGCATGCGGATA	68/58/50*	126 – 178
CL20	(AG) ₂₁	F ACCAATCTCAATCATCGAGC R GTGCGGGTGAATGTAGAGTT	60,5	100 – 148
CL27	(TC) ₂₅	F GAATATAACAATGCACCGCAA R CTCCAAAAGCCATGCAAG	68/58/50*	176 – 338
CL32	(AG) ₂₄	F GTGAGAGTATGGAATGTAAC R TAGTCATGAAAATAGGAGTG	52	110- 250
CL34	(AG) ₃₃	F TGTTGACATGACACTAATTC R ACAACCGACTTATTGGA	51,3	172 – 330
CL37	(TC) ₂₄	F GCAGCTGTTCTTGTGACT R CAAGAATCCGTGACTTCATC	54,5	118 – 176

* Para a amplificação do DNA de *Copaifera langsdorffii* com os *primers* CL02, CL06 e CL27 foi usado o Programa SSR universal para encontrar a temperatura ideal de anelamento.

3.2.3 Análises estatísticas

3.2.3.1 Análise da diversidade genética, endogamia e equilíbrio de Hardy-Weinberg

A diversidade genética para amostras de sementes do fragmento florestal e de árvores isoladas foi caracterizada para o número total de alelos (A), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Todas estas análises foram rodadas utilizando o programa FSTAT, versão 2.9.3.2. (GOUDET, 1995). Os níveis de endogamia dentro das amostras foram quantificados pelo índice de fixação (F). Foi utilizado o programa Spagedi 1.3 (HARDY; VEKEMANS, 2002) para calcular os valores de F utilizando-se a frequência alélica da geração parental (adultos) como referência. Para determinar se tais valores de F eram significativamente diferentes de zero foi utilizado 10.000 permutações e uma correção sequencial de *Bonferroni* pra múltiplas comparações (95%, $\alpha=0,05$).

O índice de fixação estimado nas progênies (F_o) foi utilizado para determinar a contribuição de autofecundação e cruzamentos entre parentes para a endogamia total. Como a espécie é auto-compatível, a endogamia observada nas progênies (F_o) pode ser explicada pela ocorrência de autofecundação (F_s) e cruzamentos entre parentes (F_{m-ts}): $\hat{F}_o = \hat{F}_s + \hat{F}_{m-ts} = 0,5\hat{s}(1 + \hat{F}_p) + (1 - \hat{s})\hat{\Theta}_p$, em que s é a taxa de autofecundação, F_p é o coeficiente de endogamia na população parental, e Θ_p é o coeficiente de coancestria na população parental efetivamente reprodutiva (SEBBENN, 2006). A endogamia total nas progênies, atribuída a autofecundação foi estimada por $\hat{F}_s = 0,5\hat{s}(1 + \hat{F}_p)$ e, atribuída ao cruzamento entre parentes por $\hat{F}_{m-ts} = (1 - \hat{s})\hat{\Theta}_p$. Assim, a porcentagem de endogamia nas progênies atribuída a autofecundação foi estimada como $P_{F_s} = 100(F_s / F_o)$ e a atribuída a cruzamentos entre parentes por $P_{m-ts} = 100(F_{m-ts} / F_o)$. A fração de endogamia na descendência atribuída ao cruzamento entre parentes também foi estimada pela correção de t entre os locos ($r_{t(l)}$) e a fração devido à autopolinização por $1 - r_{t(l)}$, utilizando o programa MLTR (RITLAND, 2002).

3.2.3.2 Sistema de reprodução

As análises do sistema de reprodução foram baseadas no modelo misto de reprodução (RITLAND; JAIN, 1981) e modelo de cruzamentos correlacionados (RITLAND, 1989) e as estimativas obtidas utilizando o programa “Multilocus MLTR” (RITLAND, 2002). As análises foram estimadas em nível de árvore matriz e em nível populacional. O método numérico utilizado foi de máxima verossimilhança EM (*Maximization Expectation*) em nível de árvores matrizes e o Newton-Rapson em nível de populações. Os parâmetros estimados foram taxa populacional de cruzamento multiloco (t_m), taxa populacional de cruzamento uniloco (t_s), taxa de cruzamento entre aparentados ($t_m - t_s$) e correlação multiloco de paternidade ($r_{p(m)}$). O intervalo de confiança das estimativas foi obtido por 1000 reamostragens *bootstraps*. As unidades de reamostragens foram às progênies na análise populacional e plantas dentro de progênies nas análises individuais por progênie. Estes parâmetros foram utilizados para estimar outros parâmetros demográficos e genéticos, como: número efetivo de árvores efetivamente polinizadoras ($\hat{N}_{ep} = 1/\hat{r}_p$) e o coeficiente médio de coancestria (Θ) entre plantas dentro de progênies, calculado pela seguinte expressão:

$$\hat{\Theta} = 0.125(1 + \hat{F}_p)[4\hat{s} + (\hat{t}_m + \hat{s}\hat{t}_m\hat{r}_s)(1 + \hat{r}_p)] \quad (\text{RITLAND, 1989}).$$

Para estimar a representatividade genética das progênies, foi estimado o tamanho efetivo médio de variância dentro de progênie ($N_{e(v)}$):

$$\hat{N}_{e(v)} = \frac{0,5}{\left[\hat{\Theta}_{xy} \left(\frac{n-1}{n} \right) + \frac{1 + \hat{F}_o}{2n} \right]} \quad (\text{COCKERHAM, 1969});$$

em que, n é o tamanho amostral. O número de árvores matrizes para a coleta de sementes foi calculado assumindo que o objetivo é reter na amostra total o tamanho efetivo de referência de 150, $\hat{m} = N_{e(\text{referência})} / \hat{N}_{e(v)}$ (SEBBENN, 2003).

3.2.3.3 Taxa de sobrevivência

Para avaliar a taxa de sobrevivência das sementes, estas foram germinadas no viveiro da Companhia Energética de São Paulo (CESP) localizada no município de Três Lagoas/ MS (Figura 9). No viveiro, as sementes foram estabelecidas separadamente por árvore matriz e a taxa de sobrevivência foi avaliada aos oito meses após a semeadura. A taxa de sobrevivência foi estimada dividindo o número de sementes sobreviventes (emergência) pelo número total de sementes postas para germinar. Para verificar a existência de associação entre a sobrevivência e o índice de fixação e a taxa de autofecundação de cada progênie foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Este coeficiente de correlação foi estimado utilizando-se o programa SAS (SAS, 1999).



Figura 9. Semeadura realizada no viveiro da Companhia Energética de São Paulo (CESP), localizado no município de Três Lagoas - MS. Fotos: *Ricardo de Oliveira Manoel*

3.2.3.4 Análise do fluxo gênico e dispersão de pólen

A estimativa do fluxo contemporâneo de pólen foi realizada utilizando análise de paternidade e o programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007; MARSHALL et al., 1998). A análise de paternidade foi conduzida a partir dos genótipos das 371 progênies do fragmento florestal, 20 progênies provenientes da árvore localizada mais próxima do fragmento e de 112 de árvores adultas do fragmento florestal e a árvore isolada. O fluxo gênico crítico ou, em outros termos, a probabilidade de encontrar um candidato compatível como pai de uma semente dentro da população, quando o verdadeiro pai encontra-se fora da população, foi estimado por $C_{GF} = 1 - (1 - P_{nexcl})^n$, em que no presente caso, P_{nexcl} é a probabilidade de não exclusão do segundo pai e n é o número de pais das sementes encontrados no interior do fragmento (DOW; ASHLEY, 1998). Quando a mesma árvore-matriz designada como o pai de uma semente, essa semente é considerada provinda de autofecundação. Assim, a taxa de autofecundação foi estimada como a proporção de progênies determinadas como autofecundadas em relação ao total de progênies amostradas. Como todas as árvores da população tinham o seu genótipo determinado e sua posição espacial conhecida, em termos de coordenadas X e Y , as progênies que tiverem o pai determinado dentro do fragmento florestal foram utilizadas para determinar as distâncias mínima, máxima, média e mediana e o desvio padrão de dispersão de pólen. A taxa de imigração de pólen e sementes (m) foi calculada como a proporção de sementes que não tiveram um candidato a pai determinada dentro das populações ($n_{imigrante}$) em relação ao total de sementes genotipadas (n_{total}) dentro da população, $\hat{m} = \hat{n}_{imigrante} / n_{total}$ (BURCZYK et al.; 1996, 2004; SMOUSE; SORK, 2004). Também foi estimada a taxa de autofecundação por análise de paternidade. A área efetiva de vizinhança de polinização (A_{ep}) foi calculada para cada árvore matriz da variância de dispersão de pólen (σ^2), assumindo que esta corresponde a uma área circular ao redor de uma árvore matriz localizada no centro do círculo, $\hat{A}_{ep} = 2\pi\hat{\sigma}^2$ (LEVIN, 1988).

3.2.3.5 Análise do coeficiente médio de coancestria e tamanho efetivo populacional

As progênes que o pai foi encontrado no interior do fragmento foram utilizadas para estimar o coeficiente médio de coancestria dentro das progênes (Θ) com base no método de Moraes e Sebbenn (2010), como:

$$\hat{\Theta} = \frac{0,5n_{ss} + 0,25n_{fs} + 0,125n_{hs} + 0,25n_{so}}{n^2 - n}$$

em que n é o número de sementes amostradas por progênie; n_{ss} , n_{fs} , n_{hs} e n_{so} são o número de irmãos de autofecundação, irmãos-completos, meio-irmãos e pares de irmãos de autofecundação e cruzamento, estimados como: $n_{ss} = n_s(n_s - 1)$, $n_{fs} = \sum_{i=1}^k n_i(n_i - 1)$,

$n_{hs} = 2 \sum_{i=1}^k n_i \sum_{j \neq i}^k n_j$, e $n_{so} = 2n_s n_o$. Nestes cálculos, n_s e n_o são os números de irmãos de autofecundação e cruzamento ($n_o = n - n_s$), respectivamente; $\sum_{i=1}^k$ é a soma de todos os pais;

n_i e n_j são o número de sementes dos pais i e j , respectivamente. O coeficiente médio de coancestria total de progênes (Θ_t) foi calculado como,

$$\hat{\Theta}_t = \frac{\sum_{l=1}^m (0,5n_{ss} + 0,25n_{fs} + 0,125n_{hs} + 0,25n_{so}) + 0,125n_{phs} + 0,25n_{pfs}}{n_t^2 - n_t},$$

em que n_t é o número total de sementes de todas as progênes em que o pai foi encontrado dentro da população; $\sum_{i=1}^m$ é a soma entre as mães; n_{ss} , n_{fs} , n_{hs} e n_{so} foram anteriormente

definidos; n_{phs} é o número de meio-irmãos paternos $n_{phs} = 2 \sum_{i=1}^m \sum_{j \neq i}^m n_{ij} n_{ik}$; n_{ij} e n_{ik} são o

número de sementes do pai i com as mães j e k , respectivamente; n_{pfs} é o número de irmãos-

completos entre as progênes: $n_{pfs} = 2 \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^m n_{ij} n_{ji}$ ($i \neq j$), n_{ij} é o número de sementes da

árvore-matriz j filhas do pai i e n_{ji} é o número de sementes da árvore-matriz i com o pai j . O

tamanho efetivo populacional de variância ($N_{e(v)}$) dentro das progênes foi calculado por,

$\hat{N}_{e(v)} = 0.5 / [\hat{\Theta}(n-1)/n + (1 + \hat{F}_o)/2n]$ (COCKERHAM, 1969), em que n é o tamanho da

progênie e F_o é o coeficiente de endogamia nos descendentes. O tamanho efetivo de variância total dentro de progênies ($N_{e(t)}$) foi calculado utilizando a mesma expressão, mas substituindo Θ por Θ_t .

Utilizou-se o método de Sebbenn (2006) para estimar o número de árvores matrizes (m) necessárias para coleta de sementes. Este modelo é baseado na relação entre o tamanho efetivo populacional proposto para o programa de conservação ($N_{e(reference)}$) e o tamanho efetivo médio de variância dentro de progênies ($N_{e(v)}$): $\hat{m} = N_{e(reference)} / \hat{N}_{e(v)}$. Esta estimativa baseia-se em três pressupostos: *i*) as sementes foram amostradas de árvores matrizes não parentes; *ii*) cada árvore matriz recebeu o pólen de um conjunto de pólen diferente (ausência de meio-irmãos paternos e irmãos-completos entre as progênies) e; *iii*) todas as progênies têm a mesmo tamanho efetivo populacional (todas as progênies tem o mesmo coeficiente de coancestria, coeficiente de endogamia e tamanho amostral). Como referência para o tamanho efetivo populacional para a conservação *ex situ*, adotou-se o $N_{e(reference)}$ de 150. Este número corresponde a três vezes o clássico $N_{e(reference)}$ de 50, sugerido por Frankel e Soulé (1981) para conservação *ex situ* no curto prazo. Este número foi multiplicado seguindo sugestão de Nunney e Campbell (1993) para compensar as possíveis diferenças genéticas, demográficas e reprodutivas entre populações naturais e da população ideal utilizada por Frankel e Soulé (1981) para determinar o número alvo de 50. O número de árvores-matriz (m) necessárias para coleta de sementes também foi calculado a partir do tamanho efetivo populacional total ($N_{e(t)}$). Se m_s progênies amostradas representam o tamanho efetivo populacional total de $N_{e(t)}$, então m árvores-matriz serão necessárias para o conjunto de progênies atingirem um tamanho efetivo populacional exigido ($N_{e(reference)}$): $\hat{m} = m_s N_{e(reference)} / \hat{N}_{e(t)}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Diversidade genética e endogamia

Os locos microssatélites utilizados apresentaram altos níveis de diversidade genética nas amostras de adultos e sementes do fragmento florestal (Tabela 2). Um maior número de alelos foi observado nos adultos (186) do que nas sementes das árvores do fragmento florestal (128). O número médio de alelos por locos seguiu obviamente o mesmo padrão entre as amostras.

A heterozigosidade observada foi significativamente maior nos adultos do que a observada nas sementes de polinização aberta do fragmento florestal. Por sua vez, a heterozigosidade esperada foi similar à encontrada nas sementes do fragmento florestal. A heterozigosidade observada foi significativamente menor do que a heterozigosidade esperada em todos os locos e, conseqüentemente, os valores do índice de fixação foram positivos e significativamente diferentes de zero em todos os locos (Tabela 2), sugerindo forte endogamia nas progênies.

C. langsdorffii é uma espécie auto-compatível, predominantemente de cruzamento, embora, certa taxa de autofecundação (8%) e cruzamentos entre parentes (4%) tenham sido detectados (OLIVEIRA et al., 2002). Na presente população, os dois fenômenos podem ter ocorrido. A autofecundação foi estimada pela análise de paternidade em 8% e a taxa de cruzamento entre parentes foi estimada pelo modelo misto de reprodução em 47,8%. Esta alta taxa de cruzamento entre parentes pode ser explicado pelo fato de que os indivíduos adultos reprodutivos da população estudada apresentam uma forte estrutura genética espacial (SGS) intra-populacional em até 50 m (SEBBENN et al., 2011) e os presentes resultados indicam que 50% dos grãos de pólen foram dispersos até 53 m. Esta SGS corresponde a uma área de vizinhança de 0,78 ha, que é maior do que a área de vizinhança de polinização média efetiva estimada a partir da análise de paternidade (0,68 ha). Assim, muitos cruzamentos, principalmente entre parentes, ocorreram dentro da área da SGS. A autofecundação e cruzamento entre parentes geram endogamia, embora cruzamento entre parentes gere uma taxa de endogamia menor do que a autofecundação. A autofecundação produz no mínimo 50% de endogamia a cada geração [$F = 0,5s(1 + F_p)$], em que, F e F_p são a endogamia nas

progênies e na população parental, respectivamente, e s é taxa de autofecundação], enquanto, que o cruzamento entre parentes produz taxa igual ao coeficiente de coancestria na geração parental. Assim, o nível médio de endogamia observada no fragmento florestal ($F_o=0,128$) e na árvore isolada ($F_o=0,154$) poderia ter sido gerado pelo cruzamento entre meios-irmãos ($\theta_{xy} = 0,125$). A partição da endogamia total nas progênies indica que grande parte foi causada por cruzamentos entre parentes. No entanto, se isto for verdade, o coeficiente médio de coancestria entre os cruzamentos entre parentes deveria estar entre as esperadas em irmãos-completos ou pais e progênies (0,25) e para irmãos de autofecundação F_1 (0,5). Além disso, esta pode ser uma superestimativa da endogamia na descendência da progênie devido à mistura de diferentes progênies (Efeito de Wahlund entre as progênies). Esta provável estimativa excessiva pode ser corrigida, excluindo o efeito de Wahlund entre as progênies, representada pela diferenciação genética entre as progênies. Em um contexto de correlação intra-classe (quanto maior for a coancestria dentro das progênies, maior é a diferenciação genética entre as progênies), a diferenciação genética entre as progênies correspondem à coancestria média dentro das progênies ($\Theta=0,182$, Tabela 7). Utilizando a clássica relação entre as estatísticas F e, admitindo $F = F_o$ e $\Theta_F = \Theta$, a endogamia nas progênies (f) devido ao sistema reprodução (autofecundação e cruzamentos entre parentes), pode ser estimado como $f=(F_o-\Theta)/(1-\Theta)$ (WEIR, 1996, pag. 176). Assim, substituindo os valores na expressão anterior, pode-se concluir que a endogamia na descendência devido a autofecundações, acrescido do cruzamento entre parentes é 0,226 ($f = (0,367-0,182)/(1-0,182)$), Tabela 2). Subtraindo a endogamia devido à autofecundação (0,046), da endogamia devido ao cruzamento entre parentes (0,226-0,046=0,180), esta pode ser explicada por meio de cruzamento entre os meios-irmãos (0,125) e irmãos-completos (0,25). Conseqüentemente, da endogamia total das progênies, 20% [$100(0,046/0,226)$] parece ser causada por autofecundação e 80% [$100(0,180/0,226)$] por cruzamentos entre parentes. Outra explicação para os altos níveis de endogamia observados pode ser pela presença de alelos nulos nos locos. Alelos nulos aumentam o número de indivíduos supostamente homozigotos, visto que apenas um dos alelos amplifica em caso de plantas heterozigotas para o alelo nulo. Porém, a análise de segregação das progênies não evidenciou a presença de tais alelos em nenhum dos oito locos utilizados.

Tabela 2. Diversidade genética, índice de fixação e poder de exclusão de locos microssatélites em árvores adultas e sementes de árvores matrizes do fragmento florestal de *Copaifera langsdorffii*. A é o número total de alelos; H_e é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; H_o é a heterozigosidade observada; F_o é o índice de fixação; $P_{2^\circ \text{ Parente}}$ é a probabilidade de excluir o segundo parente (quando nenhum dos parentes é conhecido).

Loco	Adultos (n=112)					Progênies Bosque (n=371)			
	A	H_o	H_e	F_o	$P_{2^\circ \text{ Parente}}$	A	H_o	H_e	F_o
CL 01	33	0,909	0,912	0,003	0,308	18	0,652	0,893	0,270 *
CL 02	29	0,723	0,909	0,205*	0,311	15	0,505	0,896	0,436 *
CL 06	13	0,477	0,829	0,425*	0,509	16	0,487	0,906	0,462 *
CL 20	14	0,818	0,855	0,043	0,459	16	0,587	0,919	0,361 *
CL 27	20	0,757	0,910	0,168*	0,315	13	0,517	0,901	0,426 *
CL 32	34	0,860	0,931	0,076	0,254	18	0,507	0,900	0,437 *
CL 34	24	0,832	0,892	0,067	0,362	16	0,629	0,802	0,216 *
CL 37	19	0,682	0,906	0,247*	0,330	16	0,581	0,843	0,311 *
Média	23,2	0,757	0,893	0,152*	--	16	0,558	0,883	0,367 *
CI 95%	$\pm 0,81$	$\pm 0,013$	$\pm 0,030$	--	--	$\pm 0,16$	$\pm 0,006$	$\pm 0,004$	--
Total	186	--	--	--	0,9999	128	--	--	--

$P < 0,05$.

4.2 Sistema de reprodução

4.2.1 Taxa de cruzamento

De acordo com a estimativa da taxa de cruzamento multilocus (t_m), *C. langsdorffii* é uma espécie predominantemente de cruzamento (Tabelas 3 e 4). Este resultado está de acordo com a taxa de cruzamento estimada para uma população da espécie a partir de locos de isoenzimas ($\hat{t}_m = 0,917$, OLIVEIRA et al., 2002).

Os cruzamentos favorecem a manutenção e ampliação da diversidade genética nas populações devido à recombinação de genótipos. Isso é altamente favorável a manutenção da viabilidade genética evolutiva das populações, pois a diversidade genética é a matéria-prima da evolução, bem como do melhoramento genético. Populações com alta diversidade genética são mais propícias à sobrevivência em circunstâncias de pressão seletiva natural, visto que

esta última pode favorecer a sobrevivência dos genótipos mais adaptados e eliminar os menos adaptados às novas condições ambientais.

Tabela 3. Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução em progênes de *Copaifera Langsdorffii* em uma população (fragmento florestal).

Parâmetro	Taxa
Taxa de cruzamento multiloco: t_m	0,933 (0,919-0,947)
Taxa de cruzamento uniloco: t_s	0,455 (0,429-0,481)
Taxa de cruzamento entre parentes: $t_m - t_s$	0,478 (0,453-0,503)
Correlação de autofecundação: r_s	0,182 (0,141-0,223)
Correlação multiloco de paternidade: $r_{p(m)}$	0,846 (0,814-0,878)
Número médio de árvores polinizadoras: $1/r_p$	1,18 (1,14-1,23)
Coancestria média dentro de progênes: Θ	0,237 (0,234-0,240)
Tamanho efetivo de variância: $N_{e(v)}$	2,02 (2,00-2,04)
Número de matrizes: m	74 (73-75)

m é o número de árvores matrizes necessárias para a coleta de sementes visando reter o tamanho efetivo de 150.

A estimativa da taxa de cruzamento multilocus foi significativamente diferente da unidade (1,0), o que confirma a presença de autofecundações (Tabela 3). Contudo, esta taxa pode ter sido menor no momento da reprodução, visto que se avaliou sementes que foram germinadas e algumas originadas de autofecundação podem ter sido eliminadas. Uma possível explicação pode estar associada à depressão por endogamia, que pode ter resultado na eliminação de grande parte das sementes originadas de autofecundação. A depressão por endogamia tem potencial para alterar a taxa de cruzamento entre o momento de fertilização e de avaliação dos genótipos por marcadores moleculares. Este fenômeno foi descrito nas espécies arbóreas tropicais *Pseudobombax mungumba* (GRIBEL; GIBBS, 2002), *Platypodium elegans* (HUFFORD; HAMRICK, 2003), *Pinus chiapensis* (DEL CASTILLO; TRUJILLO, 2008). Isso também pode ter acontecido no presente caso, o que resultou no aumento da taxa de cruzamento.

4.2.2 Taxa de cruzamento entre parentes

Uma alta taxa de cruzamento entre parentes foi detectada nas árvores do fragmento florestal. A taxa de cruzamento unilocos (Tabela 3) foi significativamente menor do que a unidade. Consequentemente, a diferença entre a taxa de cruzamento multilocus e unilocos, que mede a taxa de cruzamento entre parentes, foi alta (mínimo de 0,475). A alta taxa de cruzamento entre parentes era esperada, visto que a população apresenta forte estrutura genética espacial intrapopulacional (SEBBENN et al., 2011), o que permite o cruzamento entre parentes, especialmente se o pólen for disperso a curtas distâncias.

4.2.3 Taxa de cruzamentos correlacionados

A correlação de autofecundação, que mede em termos práticos a variação na taxa de cruzamento individual, foi significativamente diferente de zero entre os indivíduos do fragmento florestal. Este resultado pode ser explicado observando-se a variação na taxa de cruzamento individual, apresentada na Tabela 4. A taxa de cruzamento variou entre as árvores do fragmento florestal de 0,726 a 0,997, o que sugere que a espécie não é auto-incompatível. Um resultado surpreendente foi às altas correlações de paternidade nas árvores do fragmento florestal, especialmente pelo fato de que os frutos de *C. langsdorffii* contêm apenas uma semente.

Tabela 4. Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução em árvores adultas e sementes de árvores matrizes do fragmento florestal de *Copaifera langsdorffii*. t_m é a taxa de cruzamento multilocus; $t_m - t_s$ é a taxa de cruzamento entre parentes; $r_{p(m)}$ é a correlação multilocus de paternidade; Θ é a coancestria dentro de progênie; N_e é o tamanho efetivo da progênie; média \pm erro padrão da média 95% de probabilidade.

Progênie	t_m	$t_m - t_s$	$r_{p(m)}$	$1/r_{p(m)}$	Θ	N_e
1	0,919 \pm 0,043	0,334 \pm 0,044	0,396 \pm 0,027	2,53	0,188	2,63
2	0,919 \pm 0,020	0,406 \pm 0,021	0,850 \pm 0,014	1,18	0,236	2,12
3	0,997 \pm 0,002	0,396 \pm 0,016	0,491 \pm 0,042	2,04	0,187	2,64
4	0,997 \pm 0,002	0,471 \pm 0,010	0,909 \pm 0,012	1,10	0,239	2,09
5	0,997 \pm 0,002	0,179 \pm 0,007	0,868 \pm 0,018	1,15	0,234	2,13
6	0,997 \pm 0,002	0,527 \pm 0,013	0,897 \pm 0,005	1,11	0,237	2,10
7	0,997 \pm 0,002	0,589 \pm 0,009	0,900 \pm 0,010	1,11	0,238	2,10
8	0,995 \pm 0,002	0,466 \pm 0,012	0,756 \pm 0,022	1,32	0,220	2,26
9	0,997 \pm 0,002	0,464 \pm 0,014	0,851 \pm 0,016	1,18	0,231	2,15
10	0,997 \pm 0,002	0,213 \pm 0,010	0,586 \pm 0,040	1,71	0,199	2,49
11	0,919 \pm 0,021	0,548 \pm 0,018	0,875 \pm 0,008	1,14	0,238	2,09
12	0,726 \pm 0,044	0,404 \pm 0,037	0,833 \pm 0,005	1,20	0,258	1,94
13	0,997 \pm 0,002	0,384 \pm 0,016	0,570 \pm 0,032	1,75	0,197	2,52
14	0,760 \pm 0,024	0,532 \pm 0,018	0,972 \pm 0,000	1,03	0,262	1,91
15	0,900 \pm 0,108	0,546 \pm 0,107	0,996 \pm 0,107	1,00	0,252	1,91

Altas correlações de paternidade têm sido observadas em algumas espécies arbóreas tropicais como *Jacaranda copaia* ($r_p = 0,780$, JAMES et al., 1998), *Stemmadenia donnell-smithii* ($r_p = 0,970$, JAMES et al., 1998), *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (r_p variando de 0,749 a 0,986, SEOANE et al., 2001) e *Theobroma grandiflorum* ($r_p = 0,930$, ALVES et al., 2003). Contudo, em geral, em espécies com frutos que contém muitas sementes, a correlação de paternidade tem sido observada maior dentro de frutos do que entre frutos, como relatado em *Pachira quinata* (dentro de frutos: $r_p = 0,638$, entre frutos: $r_p = 0,252$, dentro de frutos: $r_p = 0,990$, entre frutos: $r_p = 0,120$, QUESADA et al., 2001), *Samanea saman* (floresta contínua: dentro de frutos: $r_p = 0,990$, entre frutos: $r_p = 0,120$; CASCANTE et al., 2002) e *Theobroma cacao* (dentro de frutos: $r_p = 0,607$, entre frutos: $r_p = 0,099$, SILVA et al., 2011). Também tem sido observado que a correlação de paternidade pode ser afetada pela densidade populacional, como reportado em *Pachira quinata* (dentro de frutos: $r_p = 0,740$, entre frutos: $r_p = 0,470$, FUCHS et al., 2003). Neste estudo, devido a cada fruto conter uma só semente e a população reprodutiva ser razoavelmente grande (112 indivíduos), era esperado uma baixa

correlação de paternidade nas árvores do fragmento florestal, pelo maior tamanho de vizinhança de polinização (número potencial de árvores polinizadoras). A surpreendente correlação de paternidade no fragmento florestal pode ter sido gerada por variação na fenologia de florescimento, associada a um pequeno número de árvores florescendo ao mesmo tempo. *C. langsdorffii* apresenta florescimento supra-anual e nem todas as árvores florescem todos os anos, o que pode ter contribuído para este resultado.

A alta correlação de paternidade média populacional sugere que apenas duas árvores efetivamente polinizarão cada uma das árvores matrizes. Portanto, grande parte das sementes são irmãos-completos. Em consequência disso, a coancestria e o tamanho efetivo dentro de progênies foram próximos aos valores esperados em progênies de irmãos-completos ($\Theta = 0,25$; $N_e = 2,0$). Isso, por sua vez, resultou na necessidade de coletar sementes para fins de conservação genética, recuperação ambiental e melhoramento florestal de pelo menos 76 árvores do fragmento florestal. É importante ressaltar que esta última estimativa é baseada em três pressuposições: i) que as árvores matrizes não são parentes entre si; ii) que as árvores matrizes não se cruzam entre si e; iii) que as árvores matrizes recebem pólen de diferentes conjuntos gênicos, ou seja, não existe sobreposição no conjunto de pólen das diferentes árvores. Evidentemente, estas pressuposições são violadas no fragmento florestal, visto a presença de estrutura genética espacial até aproximadamente 50 m no fragmento florestal e, devido à sobreposição no pool de pólen que diferentes árvores recebem, o que por sua vez, pode envolver a presença de meios-irmãos paternos. Portanto, para coletar-se sementes para fins de conservação genética, recuperação ambiental e melhoramento florestal, o número de árvores matrizes deve ser maior ainda do que o estimado.

4.3 Taxa de sobrevivência e associações com o índice de fixação e taxa de autofecundação

A taxa de sobrevivência após oito meses da semeadura foi baixa; variou entre árvores matrizes do fragmento florestal de 14% a 60%, com média de 28% (Tabela 5). O coeficiente de correlação de Spearman entre a sobrevivência e o índice de fixação não foi significativo entre as árvores do fragmento florestal ($\rho=0,14$, 13 graus de liberdade, $P>0,05$). Da mesma forma não foi observada nenhuma associação entre a sobrevivência e a taxa de autofecundação no fragmento florestal ($\rho=0,28$, 13 graus de liberdade, $P>0,05$).

Tabela 5. Taxa de sobrevivência individual por árvore matriz de *Copaifera langsdorffii*, provenientes de árvores do fragmento florestal aos oito meses após a semeadura em viveiro.

Progênie	Nº sementes	Emergência (%)
9	192	49 (25%)
10	110	27 (24%)
13	192	86 (45%)
16	178	106 (60%)
21	191	62 (32%)
34	72	23 (32%)
38	192	27 (14%)
54	150	44 (29%)
64	152	26 (17%)
65	192	51 (27%)
96	192	32 (17%)
97	176	33 (19%)
101	192	58 (30%)
103	192	59 (31%)
110	192	42 (22%)
Total	2565	725 (28%)
IC 95%		22 a 34%

IC: intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade estimada entre progênies.

4.4 Análise de fluxo gênico e dispersão de pólen

4.4.1 Fluxo gênico

O poder de exclusão teórica do segundo pai (quando um dos pais é conhecido, no presente caso, a árvore-matriz), medido nos genótipos dos adultos variou entre os locos de 0,254 a 0,509, com valor combinado sobre locos de 0,9999 (Tabela 2). Assim, a probabilidade de fluxo gênico crítico foi baixa, 0,005 ($1-0,9999^{49}$). Conseqüentemente, o número de progênies que o doador de pólen foi erroneamente determinado dentro do fragmento florestal foi estimada em apenas 1,7 ($343 \times 0,005$), o que representa 0,5% ($2/343$) do número total de sementes amostradas no fragmento, indicando que os níveis de fluxo gênico crítico não teriam viés segundo as estimativas de fluxo de pólen.

A população estudada de *C. langsdorffii* não está reprodutivamente isolada. De 371 progênies amostradas no fragmento florestal (Tabela 6), um putativo doador de pólen foi atribuído a 343 progênies (92%), sugerindo uma taxa de imigração de pólen de 8% (m_{polen}). Em comparação com os 4,7% observados de imigração de pólen realizado, estimado anteriormente nos regenerantes (altura variando de 7 a 1,16 cm) no interior do fragmento (SEBBENN et al., 2011), a imigração contemporânea de pólen foi aproximadamente o dobro. Efeitos determinísticos e aleatórios podem alterar a composição genética entre as sementes e as fases de plântula. A taxa de imigração de pólen também pode mudar entre os diferentes eventos reprodutivos. Assim, esta diferença na dispersão do pólen efetivo e realizado é esperada. A mensagem mais importante deste resultado é que este fragmento espacialmente isolado não é geneticamente isolado e foi observada quantidade de imigração de pólen substancial durante eventos reprodutivos desta espécie arbórea tropical de florescimento supra-anual.

Das 343 progênies que tiveram putativo doador de pólen, 31 tinham o mesmo indivíduo como doador de pólen e podem representar autofecundação ($s = 8\%$). As 28 progênies restantes que o pai não foi encontrado no fragmento, o pólen pode ter sido originado de árvores localizadas fora do fragmento. No entanto, nenhuma das progênies do fragmento teve como pai a árvore isolada, localizada a 1,2 km do fragmento. Isto sugere que outras árvores não amostradas e distantes mais de 1,2 km foram os pais dos 8% das progênies detectadas como produzidas pela imigração de pólen.

A partir de 112 árvores candidatas a doadoras de pólen, detectou-se que 49 (43%) foram pais de pelo menos um filho (variando de 1-28 progênies). Em contrapartida, verificou-se que uma única semente da árvore-matriz isolada foi gerada por uma árvore do fragmento florestal (emigração de pólen). De 20 progênies amostradas na árvore-matriz isolada (Tabela 6), um doador de pólen foi atribuído a cinco progênies (25%). A partir destas cinco progênies, quatro parecem ser originadas de autofecundação e um teve o pai no fragmento florestal. As outras 15 progênies que o pai não foi encontrado, provavelmente, o pólen é proveniente de árvores não amostradas e não localizadas no fragmento florestal. Isso indica que essa árvore espacialmente isolada também não estava isolada reprodutivamente e não é uma morta-viva, como previsto pela hipótese clássica de Janzen (JANZEN, 1986) para árvores isoladas na paisagem. No entanto, esta árvore isolada teve uma taxa de autofecundação substancial (20%) e esta taxa foi maior do que geralmente detectada em sementes de árvores do fragmento (Tabela 6). O isolamento espacial deste indivíduo pode ser a causa da taxa de autofecundação observada, fazendo com que as abelhas forrageiam mais tempo ou entre muitas flores da mesma árvore antes de voar para outra árvore coespecífica. Resultados similares de maior taxa de autofecundação em árvores isoladas do que em árvores que ocorrem em grupos já foi relatado em outros estudos com espécies arbóreas (DICK et al., 2003; LANDER et al., 2010; MORAES; SEBBENN, 2010). As outras 75% das sementes amostradas na árvore-matriz espacialmente isolada foram filhas de árvores não amostradas, reforçando a ideia de que existem outros coespecíficos na paisagem e que são reprodutivamente conectados por dispersores de pólen (abelhas).

4.4.2 Distância e padrões de dispersão de pólen

Para as sementes que tiveram o pai encontrado dentro do fragmento florestal, a distância de dispersão de pólen variou de 0 a 183 m, com média de 60 m e mediana de 48 m, considerando as autofecundações e, entre 2,4 a 183m, desconsiderando as autofecundações (Tabela 6). Estas distâncias médias são muito menores do que a distância média entre as 15 matrizes e todas as outras árvores do fragmento florestal ($90,5 \text{ m} \pm 44,9 \text{ m}$), sugerindo um padrão de curta distância de dispersão do pólen. Aproximadamente 49% do pólen foi disperso até 50 m do doador de pólen. A comparação entre a curva de distribuição de frequências de dispersão de pólen e a curva de frequência da distância entre todas as árvores e as respectivas matrizes do fragmento florestal, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov ($D = 0,29, P < 0,001$; Figura 10), foi significativa, refutando a hipótese de que a distância entre as árvores reprodutivas e as árvores matrizes não explicam os padrões de dispersão de pólen. Essa forte deriva genética pode ser explicada pela variação na fenologia de florescimento das árvores de *C. langsdorffii*, que não florescem anualmente e, apenas árvores floridas ao mesmo tempo podem cruzar em cada evento reprodutivo. Esta fenologia de floração supra-anual associada a uma floração em massa de apenas alguns indivíduos da população, alta densidade populacional e distribuição agregada podem aumentar o tempo dos polinizadores nas flores de uma árvore e produzir baixa distância de dispersão de pólen e autofecundação (BRAGA; COLLEVATTI, 2010). Em outros termos, os cruzamentos não foram aleatórios, embora as árvores estejam próximas (maior distância entre duas árvores = 218 m). Além disso, houve uma correlação significativa entre o número de filhos fecundados por doadores de pólen e a distância entre as árvores paterna e materna ($R^2 = 0,71, P < 0,05$) no fragmento florestal. No entanto, não se encontrou associação significativa entre o número de filhos fecundados por doadores de pólen e seu DAP ($R^2 = 0,015, P > 0,05$), sugerindo que árvores de grande porte não geraram mais sementes do que as pequenas. A maior distância de dispersão de pólen (1,420 m) foi encontrada para a semente original da árvore matriz isolada em que o pai foi encontrado no fragmento florestal.

A distância média de dispersão efetiva de pólen dentro do fragmento (66 m) foi menor do que a estimativa de dispersão de pólen realizado anteriormente (94 m, SEBBENN et al., 2011) em regenerantes do fragmento florestal. Ambas as estimativas são, obviamente, uma distância de dispersão de pólen superestimada, considerando a taxa de imigração de pólen

observada. Os padrões de dispersão de pólen efetivo e realizado também foram diferentes. Cinquenta por cento da dispersão do pólen realizada foi dispersa até 86 m (SEBBENN et al., 2011) e, neste trabalho, cerca de 50% foi dispersa até 50 m. Essa diferença entre distância de dispersão de pólen efetiva e a realizada pode ser explicada por vários fatores, como por exemplo, os efeitos aleatórios, como a predação, depressão por endogamia e variação supra-anual na fenologia de floração.

Os padrões de cruzamentos não foram ao acaso no fragmento, sugerindo um forte deriva genética durante o evento reprodutivo. O número de alelos detectados nas progênies amostradas (128) foi substancialmente menor do que o detectado nos adultos reprodutivos (186), indicando que nem todas as árvores reprodutivas contribuíram para a nova geração de populações estudadas. Em concordância, os resultados da análise de paternidade detectaram 8% de autofecundação e, apenas 43% dos potenciais doadores de pólen fertilizaram sementes do fragmento. Observou-se também um padrão de dispersão de pólen entre o vizinho próximo dentro do fragmento, como já discutido. No entanto, apesar do padrão de distância de dispersão de pólen entre vizinhos próximos, foi possível observar uma distância de dispersão de pólen na única semente da árvore-matriz isolada que foi gerada por uma árvore do fragmento florestal (1,420 m). A capacidade das abelhas em voar a longas distâncias não é um acontecimento novo e já foi relatado em muitos outros estudos em espécies arbóreas, como por exemplo, 1,509 m em *Dinizia excelsa* (DICK et al., 2003), 16 km em *Sorbus domestica* (KAMM et al., 2009), 890 m em *Myracrodruon urundeuva* (GAINO et al., 2010) e 2.608 m em *Tabebuia aurea* (BRAGA; COLLEVATTI, 2010).

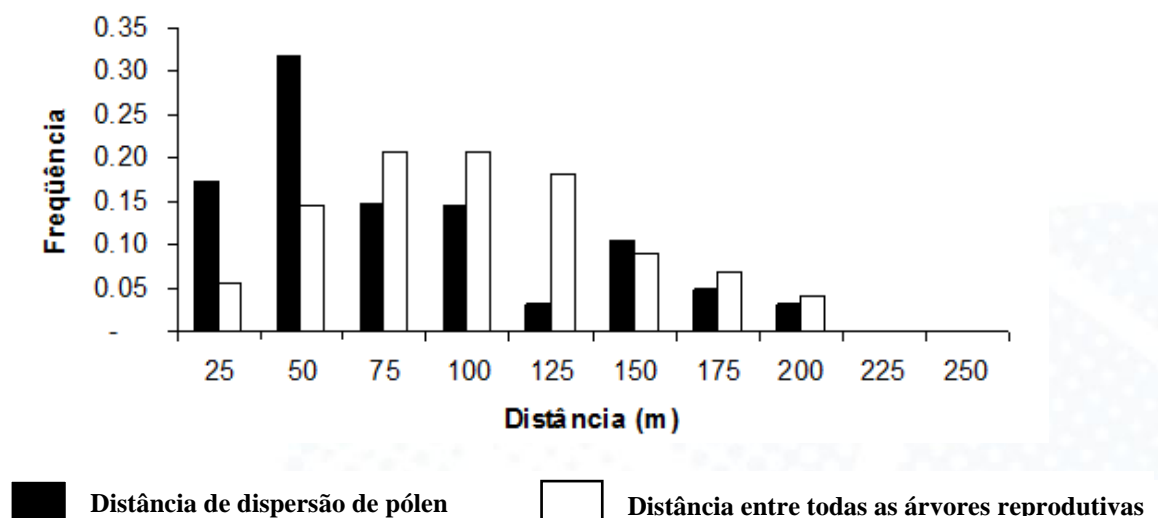


Figura 10. Padrões de distância de dispersão de pólen (barras pretas) e distância entre árvores reprodutivas e árvores matrizes amostradas (barras brancas) em *Copaifera langsdorffii*.

Tabela 6. Resultados da análise de paternidade e distância de dispersão de pólen em progênies de duas procedências de *Copaifera langsdorffii*. (*n* : tamanhoamostral; \hat{s} : taxa de autofecundação; $\hat{\delta}$: distância média de dispersão de pólen; \hat{A}_{ep} : área efetiva de vizinhança de polinização).

Matriz	<i>n</i>	Fluxo gênico			Dispersão de pólen		
		Dentro	\hat{s}	Fora	Com autofecundação	Sem autofecundação	\hat{A}_{ep} (ha)
		$\hat{\delta}$ (m) (média±SD)	\hat{A}_{ep} (ha)	$\hat{\delta}$ (m) (média±SD)	\hat{A}_{ep} (ha)	$\hat{\delta}$ (m) (média±SD)	\hat{A}_{ep} (ha)
Árv. Isolada	20	5 (0,25)	4 (0,20)	15 (0,75)	253,38	1,420,0±0,0	0
M_9	25	25 (1,00)	2 (0,08)	0 (0,00)	37,7±38,5	40,9±38,5	0,93
M_10	24	17 (0,71)	3 (0,12)	7 (0,29)	49,0±76,9	59,5±81,2	4,15
M_13	25	25 (1,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	15,8±20,0	15,8±20,0	0,25
M_16	25	25 (1,00)	2 (0,08)	0 (0,00)	36,3±58,6	39,4±60,1	2,27
M_21	25	25 (1,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	60,7±27,7	60,7±27,7	0,48
M_34	22	22 (1,00)	1 (0,04)	0 (0,00)	72,0±21,1	75,5±14,0	0,12
M_38	25	23 (0,92)	2 (0,08)	2 (0,08)	26,5±9,1	29,0±3,7	0,01
M_54	25	25 (1,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	126,9±28,5	126,9±28,5	0,51
M_64	25	19 (0,76)	7 (0,28)	6 (0,24)	34,6±32,7	54,8±23,4	0,35
M_65	25	25 (1,00)	3 (0,12)	0 (0,00)	101,3±58,9	115,1±47,9	1,44
M_96	25	23 (0,92)	0 (0,00)	2 (0,08)	67,1±23,2	67,1±23,2	0,34
M_99	25	24 (0,96)	6 (0,24)	1 (0,04)	47,6±37,4	63,4±28,8	0,52
M_101	25	25 (1,00)	4 (0,16)	0 (0,00)	26,1±14,0	31,1±8,5	0,05
M_103	25	21 (0,84)	1 (0,04)	4 (0,16)	105,2±35,1	110,5±26,2	0,43
M_110	25	19 (0,86)	0 (0,00)	6 (0,24)	95,0±60,8	95,0±60,8	2,32
Média*	371	343 (0,92)	31 (0,08)	28 (0,08)	59,8±59,9	65,7±49,6	0,68
Min-Max	-	-	-	-	0 - 183,2	2,4-183,2	-

* A média foi calculada em relação ao total.

4.4.3 Vizinhança efetiva de polinização

A área de vizinhança efetiva de polinização foi muito menor do que a área da população (4,8 ha), variando de 0,05 a 3,71 ha, com média de 0,82 ha, considerando as autofecundações e, entre 0,01 a 4,15 ha, com média de 0,68 ha, desconsiderando as autofecundações (Tabela 6). Isso indica que o pólen teve efetivamente uma dispersão restrita, mas ocorreu uma forte sobreposição entre o conjunto de pólen recebido pelas matrizes amostradas.

4.5 Análise do coeficiente médio de coancestria e tamanho efetivo populacional por análise de paternidade

O número de doadores de pólen (N_{ep}) no fragmento variou de 2 a 7, com média de 3,8 sementes por árvore, indicando que ocorreram cruzamentos correlacionados (Tabela 7). O coeficiente de coancestria (Θ) dentro de progênes foi maior (variou de 0,152 a 0,242) do que o esperado em meio-irmãos (0,125). Consequentemente, o tamanho efetivo de variância populacional dentro de progênes ($N_{e(v)}$) foi menor (variou de 1,96 a 2,97) do que o esperado em meio-irmãos (4,0). A estimativa total do coeficiente de coancestria médio de progênes (Θ_t) foi 0,01402 e o tamanho efetivo de variância populacional total da matriz das progênes ($N_{e(t)}$) foi de 31,9 (Tabela 7). Assim, o número de árvores necessárias para a coleta de sementes (m) foi estimado em 76. Portanto, a estimativa de m de $N_{e(t)}$ foi 31% maior que o estimado para o tamanho efetivo de variância populacional dentro de famílias ($N_{e(v)}$).

Tabela 7. Resultados da análise de paternidade em um pequeno fragmento florestal de *Copaifera langsdorffii*. (N_{ep} : número efetivo de doadores de pólen; Θ_t : coeficiente de coancestria; $N_{e(v)}$: tamanho efetivo de variância populacional; m : número de árvores necessárias para a coleta de sementes).

Árvore-matriz	N_{ep}	Θ_t	$N_{e(v)}$	m
Isolada	1	0,320	1,40	107
Fragmento				
M_9	4	0,174	2,67	56
M_10	3	0,192	2,38	63
M_13	5	0,178	2,61	57
M_16	3	0,186	2,51	60
M_21	3	0,169	2,75	55
M_34	4	0,181	2,56	59
M_38	4	0,176	2,63	57
M_54	5	0,157	2,93	51
M_64	2	0,242	1,96	77
M_65	4	0,174	2,68	56
M_96	5	0,155	2,93	51
M_99	4	0,204	2,31	65
M_101	2	0,207	2,29	66
M_103	7	0,152	2,97	51
M_110	2	0,183	2,51	60
Média	3,8	0,182	2,58	58
Total	--	0,01402*	31,9**	76

* O coeficiente de coancestria total foi calculado com base no cruzamento entre as árvores-matriz.

** O tamanho efetivo de variância populacional foi calculado com base no conjunto dos coeficientes de coancestria das árvores-matriz.

5 IMPLICAÇÕES DOS RESULTADOS PARA A CONSERVAÇÃO *EX SITU* E REFLORESTAMENTO AMBIENTAL

Os resultados indicam que a população estudada e a árvore isolada não estão isoladas reprodutivamente. A imigração de pólen pode reduzir os impactos negativos da deriva genética, aumentar a diversidade genética (pela imigração de novos alelos) e, conseqüentemente, aumentar o tamanho efetivo da população espacialmente isolada. Este aspecto positivo do fluxo gênico na população é interessante como fonte para coleta de sementes para conservação genética e reflorestamentos ambientais. Os reflorestamentos ambientais implicam na fundação de novas populações e, neste caso, é muito importante considerar o tamanho efetivo populacional utilizado para a fundação das novas populações.

As espécies arbóreas apresentam sobreposição de gerações e isso reduz a diversidade genética mais rápido do que em espécies com gerações discretas. Devido a isto, foi adotado o tamanho efetivo populacional de pelo menos 150 como referência para essa finalidade. Os resultados mostram que as sementes coletada do presente fragmento florestal apresentam endogamia e níveis muito elevados de coancestria dentro das progênies. Ambos, endogamia e parentesco aumentam a frequência de alelos idênticos por descendência dentro das progênies e reduzem a variação do tamanho efetivo da população abaixo do esperado em sementes coletadas de populações panmíticas ($N_{e(v)} = 4$). Além disso, se o conjunto de pólen recebido pelas árvores matrizes se sobrepõe, o tamanho efetivo populacional de sementes coletadas de árvore-matriz vai diminuir mais, devido à presença de meios-irmãos paternos (sementes de diferentes progênies, mas parentes devido ao fato de que as árvores matrizes foram fertilizadas pelo mesmo pai) e irmãos-completos (se duas árvores matrizes de cruzamento agem como doadores e receptores de pólen, ao mesmo tempo, as sementes de ambas as árvores matrizes serão irmãos completos), resultando em uma diminuição no tamanho efetivo populacional da árvore-matriz. Tal fato foi observado em ambos os eventos.

Algumas frações das progênies de árvores matrizes diferentes são meio irmãos-paternos, e, outra parte meios-irmãos, indicando que as 343 sementes que o pai foi encontrado no âmbito do fragmento representam apenas 32 indivíduos não parentes e não endogâmicos. Conseqüentemente, para manter o tamanho amostral para o reflorestamento ambiental ou planos de conservação *ex situ*, que representam o tamanho efetivo de 150, os resultados sugerem a necessidade de coletar sementes de pelo menos 76 árvores matrizes do fragmento. No entanto, com respeito aos adultos do fragmento estudado, a endogamia está relacionada à

distância entre os indivíduos (SGS), o que sugere que estas sementes devem ser colhidas não só em árvore matriz presentes no fragmento ou árvores matrizes isoladas na paisagem, mas também em outros fragmentos. Esta estratégia pode aumentar o tamanho efetivo da população amostrada, considerando que há uma probabilidade de que as árvores matrizes distantes e de diferentes fragmentos não sejam parentes e que o conjunto de pólen não se sobrepõem.

6 CONCLUSÕES

1. A população da espécie *Copaifera langsdorffii* apresenta altos níveis de diversidade genética nos adultos e menores níveis nas progênes;
2. Existem altos níveis de endogamia e coancestria nas sementes de polinização aberta, causados pelo sistema de reprodução, por autofecundações e cruzamentos entre parentes;
3. Existe fluxo gênico via pólen, logo o fragmento não está isolado reprodutivamente;
4. O pólen é disperso dentro do fragmento em alta frequência a curtas distâncias;
5. Os cruzamentos não são aleatórios na população (ocorre uma alta taxa de cruzamentos correlacionados).

REFERÊNCIAS

AHMED, S. et al. Wind-borne insects mediate directional pollen transfer between desert fig trees 160 kilometers apart. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, p. 20342-20347, 2009.

ALDRICH, P. R.; HAMRICK, J. L. Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical mosaic. **Science**, Washington, v. 281, p. 103-105, 1998.

ALENCAR, J. C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne - LEGUMINOSAE, na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 12, n. 1, p. 75-89, 1982.

ALVES, R.M. et al. Mating system in natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Shumm. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, p. 373-379, 2003.

ALZATE-MARIN, A. L. et al. Otimização de um método econômico e rápido de extração de DNA para quatro espécies de árvores tropicais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005, Águas de Lindóia. **Anais... Águas de Lindóia: [s.n.]**, 2005. p. 510. 1 CD-ROM.

ASHLEY, M. V. Plant parentage, pollination, and dispersal: how DNA microsatellites have altered the landscape. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 29, p. 148-161, 2010.

BACLES, C. F. E.; ENNOS, R. A. Paternity analysis of pollen-mediated gene flow for *Fraxinus excelsior*, L. in a chronically fragmented landscape. **Heredity**, London, v. 101, p. 368-380, 2008. .doi:10.1038/hdy.

BITTENCOURT, J. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, London, v. 99, p. 580-591, 2007. doi:10.1038/sj.hdy.6801019.

BYRNE, M. et al. Maintenance of high pollen dispersal in Eucalyptus wandoo a dominant tree of the fragmented agricultural region in Western Australia. **Conservation Genetics**, New York, v. 9, p. 97-105, 2008. doi:10.1007/s10592-007-9311-5

BRAGA, A. C.; COLLEVATTI, R. G. Temporal variation in pollen dispersal and breeding structure in a bee-pollinated Neotropical tree. **Heredity**, London, p. 1-9, 2010. doi: 10.1038/hdy.2010.134.

BURCZYK, J.; ADAMS, W. T.; SHIMIZU, J. Y. Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon) stand. **Heredity**, London, v. 77, p. 251-260, 1996.

BURCZYK, J.; DIFAZIO, S. P.; ADAMS, W. T. Gene flow in forest trees: how far do genes really travel? **Forest Genetics Ecology and Management**, Amsterdam, v. 11, p. 1-14, 2004.

BURCZYK, J. et al. Using genetic markers to directly estimate gene flow and reproductive success parameters in plants on the basis of naturally regenerated seedlings. **Genetics**, Austin, v. 173, p. 363-372, 2006.

CARNEIRO, F. S. et al. High levels of pollen dispersal in *Symphonia globulifera* in a dense Brazilian Amazon forest revealed by paternity analysis. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.258, p.1260-1266, 2009.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais potencialidades e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ/SPI, 1994. 640 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa-Informação Tecnológica, 2003. 1039 p.

CASCANTE, A. et al. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. **Conservation Biology**, Boston, v. 16, p. 137-147, 2002. doi: 10.1046/j.1523-1739.2002.00317.x.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, New York, v. 55, p. 773-778, 2000.

CHASE, M.R. et al. Distant gene flow in tropical trees. **Nature**, London, v.383, p. 398-399, 1996.

CIAMPI, A. Y.; BRONDANI, R.; GRATTAPAGLIA, D. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Copaifera langsdorffii* Desf. (Copaíba) - LEGUMINOSAE-CAESALPINIOIDEAE e otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco**. Brasília: Embrapa, 2000. 40 p. (Boletim de Pesquisa, 16).

CLOUTIER, D. et al. Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 797-809, 2007.

COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, Lancaster, v. 23, p. 72-84, 1969.

COLLEVATTI, R. G. et al. Short-distance pollen dispersal and high self-pollination in a bat-pollinated neotropical tree. **Tree Genetics & Genomes**, Berlim, v. 6, n. 4, p. 555-564, 2010. doi: 10.1007/s11295-010-0271-4.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1984. 770 p.

CRAWFORD, T. J. The estimation of neighbourhood parameters for plant populations. **Heredity**, London, v. 52, p. 273-283, 1984.

CRESTANA, C. M.; BELTRATI, C. M. Morfologia e anatomia de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (LEGUMINOSAE – CAESALPINIOIDEAE). **Naturalia**, Rio Claro, v. 13, p. 45-54, 1988.

CUNNINGHAM, S. A. Measuring the relationship between floral duration and fruit set for *Hamelia patens* (Rubiaceae). **Biotropica**, Washington, v. 26, p. 227-229, 1994.

DAVIDE, A. C.; FARIA, J. M. R.; BOTELHO, S. A. **Propagação de espécies florestais**. Belo Horizonte: CEMIG/UFLA/FAEPE, 1995. 45 p.

DAJOZ, R. **Princípios de ecologia**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed. 2005. 520 p.

DAWSON, I. K. et al. Simple sequence repeats provide a direct estimates of pollen-mediated gene dispersal in tropical tree *Gliricidia sepium*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, p. 179-183, 1997.

DEL CASTILLO, R. F.; TRUJILLO, S. Effect of inbreeding depression on outcrossing rates among populations of a tropical pine. **New Phytologist**, Lancaster, v. 177, p. 517-524, 2008. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02260.x.

DIAS, H. C. T.; OLIVEIRA-FILHO, A. T. Fenologia de quatro espécies arbóreas de uma floresta estacional semidecídua em Lavras, MG. **Cerne**, Lavras, v. 2, p. 66-88, 1996.

DICK, C. W.; ETCHELECU, G.; ASTERLITZ, F. Pollen dispersal of Neotropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and Africa honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. **Molecular Ecology**, Oxford, v.12, p. 753-764, 2003.

DOW, B. D.; ASHLEY, M. V. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. **Heredity**, London, v. 89, p. 62-70, 1998.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.

DWYER, D. The Central American, West Indian and South American species of *Copaifera* (Caesalpiniaceae). *Brittonia*, Bronx, v. 7, n. 3, p. 143-172, 1951.

ELLSTRAND, N. C. Gene flow among seed plant populations. **New Forests**, Dordrecht, v. 6, p. 241-256, 1992.

ENNOS, R. A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, London, v. 72, p. 250–259, 1994.

FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. Harlow, England: Longman. 1996.

FERNANDEZ, F. **O poema imperfeito: crônicas de biologia, conservação da natureza e seus heróis**. UFPR, 2000.

FOURNIER, L. A. **Observaciones fenológicas en el bosque humedo premontano de San Pedro de Montes Oca, Costa Rica**. Turrialba, v. 26, p. 54-59, 1976.

FRANKEL, O. H.; SOULÉ, M. S. **Conservation and evolution**. Cambridge University Press, Cambridge. 1981.

FUCHS, E. J.; LOBO, J. A.; QUESADA, M. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. **Conservation Biology**, Boston, v. 17, p. 149-157, 2003.
doi: 10.1046/j.1523-1739.2003.01140.x.

GAINO, A. P. S. C. et al. Understanding the effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree *Myrcrodruon urundeuva*. **Conservation Genetics**, New York, v. 11, p. 1631-1643, 2010. doi: 10.1007/s10592-010-0046-3.

GLAUBITZ, J. C., MURRELL, J. C., MORAM, G. F. Effects of native forest regeneration practices on genetic diversity in *Eucalyptus consideniana*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, p. 422-431, 2003.

GONZÁLES, S.; TORRES, R. A. A. Coleta de sementes. In: SALOMÃO, A. N. et al. **Germinação de sementes e produção de mudas de plantas do cerrado**. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado, 2003. p. 11-74.

GONZALEZ-MARTINEZ, S. C.; BURCZYK, J.; NATHAN, R. Effective gene dispersal and female reproductive success in Mediterranean maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton). **Molecular Ecology**, Oxford. v. 15, p. 4577-4588, 2006.

GOUDET, J. FSTAT. (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate *F*-statistics. **J. Heredity**, London, v. 86, p. 485-486, 1995.

GRIBEL, R.; GIBBS, P. E. High outbreeding as a consequence of selfed ovule mortality and single vector bat pollination in the Amazonian tree *Pseudobombax mumgunba* (Bombaceae). **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 163, p. 1035-1043, 2002.

HAMRICK, J. L.; MURAWSKI, D. A. The breeding structure of tropical tree population. **Plant Species Biology**, Kyoto, v. 5, p. 157-165, 1990.

HAMRICK, J. L. Response of forest trees to global environmental changes. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 197, p. 323-335, 2004.

HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGeDI: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, p. 618-620, 2002.

HAWLEY, G. J. et al. Silviculture alters the genetic structure of an eastern hemlock forest in Maine, USA. **Journal of Forest Research**, Canadian, v. 35, p. 143-150, 2005.

HOWE, H. F. Implications of seed dispersal by animals for tropical reserve management. **Biological Conservation**, Barking, v. 30, p. 261-281, 1984.

- HUFFORD, K. M.; HAMRICK, J. L. Viability selection at three early life stages of the tropical tree, *Platypodium elegans* (Fabaceae, Papilionoideae). **Evolution**, Lancaster, v. 57, p. 518-526, 2003. doi: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb01543.x.
- JAMES, T.; VEGE, S.; ALDRICH, P. Mating systems of three tropical dry forest tree species. **Biotropica**, Washington, v. 30, p. 587-594, 1998.
- JANZEN, D. H. **Ecologia vegetal nos trópicos**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1980. p. 21-30.
- JANZEN, D. H. The future of tropical ecology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 17, p. 305-324, 1986.
- JENNINGS, S. B. et al. Ecology provides a pragmatic solution to the maintenance of genetic diversity in sustainably managed tropical rain forests. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 154, p. 1-10, 2001.
- JONES, F. A. et al. A genetic evaluation of seed dispersal in the Neotropical tree *Jacaranda copaia* (Bignoniaceae). **American Naturalist**, Chicago, v. 166, p. 543-555, 2005.
- JONES, F. A. et al. Inferring colonization history from analyses of spatial genetic structure within populations of *Pinus strobus* and *Quercus rubra*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 851-861, 2006.
- JORDANO, P. et al. Differential contribution of frugivores to complex seed dispersal patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, p. 3278-3282, 2007.
- JUMP, A. S.; PEÑUELAS, J. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 8096-8100, 2006.
- KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 1099-1106, 2007.
- KAMM, U. et al. Frequent long-distance gene flow in a rare temperate forest tree (*Sorbus domestica*) at the landscape scale. **Heredity**, London, v. 103, p. 477-481, 2009.

KARRON, J. D. et al. The influence of population density on outcrossing rates in *Mimulus ringens*. **Heredity**, London, v. 75, p. 175-180, 1995.

KETTLE, C. J. et al. Identifying the early genetic consequences of habitat degradation in a highly threatened tropical conifer, *Araucaria nemorosa* Laubenfels. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 3581-3591, 2007.

LACY, R. C. Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection and population subdivision. **Conservation Biology**, Boston, v. 1, p. 143-158, 1987.

LANGENHEIM, J. H. **Plant resins: chemistry evolution, ecology and ethnobotany**. Portland: Timber Press, 2003.

LANDE, R.; BARROWCLOUGH, G. F. Effective population size, genetic variation, and their use in population management. In: SOULE, M. L. (Ed.). **Viable populations for conservation**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. p. 87-124.

LANDER, T. A.; BOSHIER, D. H.; HARRIS, S. A. Fragmented but not isolated: Contribution of single trees, small patches and long distance pollen flow to genetic connectivity for *Gomortega keule*, and endangered tree. **Biological Conservation**, Barking, v. 143, p. 2383-2590, 2010.

LATOUICHE-HALLE, C.; RAMBOIER, A.; BANDOUE, E. Long-distance pollen flow and tolerance to selfing in a Neotropical tree species. **Molecular Ecology**, Oxford, v.13, p.1055-1226, 2004.

LEMES, M. R. et al. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 2875-2883, 2003.

LEVIN, D. A. The paternity pool plants. **The American Naturalist**, Chicago, v. 132, p. 309-317, 1988.

LIAN, C.; MIWA, M.; HOGETSU, T. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. **Heredity**, London, v. 87, p. 88-98, 2001.

LIETH, H. Introduction to phenology and the modeling of seasonality. Phenology and seasonality modeling. **Ecological Studies** 8, Berlin, p. 3-19, 1974.

LINDGREN, D. Loss of genetic diversity monitored by status number, **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 45, n. 1, 1996.

LIRA, C. F. et al. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 3219-3225, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Intituto Plantarum, 2000. 168 p.

LOWE, A. J. et al. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation, reconciling empirical evidence and predicted theory for Neotropical trees. **Heredity**, London, v. 95, p. 255-273, 2005. doi: 10.1038/sj.hdy.6800725.

MANTOVANI, M. et al. Fenologia reprodutiva de espécies arbóreas em uma formação secundária da Floresta Atlântica. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, p. 451-458, 2003.

MARQUIS, R. J. Phenological variation in the Neotropical understory shrub *Piper arieianum*: causes and consequences. **Ecology**, Arizona, v. 69, p. 1552-1565, 1988.

MARSHALL, T. C. et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p. 639-655, 1998.

MEAGHER, T. R. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. I. Identification of most-likely male parents. **American Naturalist**, Chicago, v. 128, p.199-215, 1986.

MENDES, J. D.; SILVA, N. M. Avaliação do efeito de borda em fragmentos de cerrado por meio de métricas de paisagem, no Parque Nacional de Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE O CERRADO “DESAFIOS E ESTRATÉGIAS PARA O EQUILÍBRIO ENTRE SOCIEDADE, AGRONEGÓCIO E RECURSOS NATURAIS”, 9., 2008, Brasília. **Anais...** Brasília: [s.n.], 2008.

MORAES, M. L. T.; SEBBENN, A. M. Pollen dispersal between isolated trees in the brazilian savannah: A Case Study of the Neotropical Tree *Hymenaea stigonocarpa*. **Biotropica**, Washington, p. 1-8, 2010. doi: 10.1111/j.1744-7429.2010.00679.x.

MORELLATO, L. P. C. Sazonalidade e dinâmica de ecossistemas florestais na Serra do Japi. In: MORELLATO, L. P. C. (Org.). **História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil**. Campinas: Editora da Unicamp, 1992. p. 98-110.

MORELLATO, L. P. C.; LEITÃO-FILHO, H. F. As estações do ano na floresta. In: _____. (Orgs.). **Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana: reserva de Santa Genebra**. Campinas: Editora da Unicamp, 1995, p. 37-41.

MORGAN, M. T.; CONNER, J. K. Using genetic markers to directly estimate male selection gradients. **Evolution**, Lancaster, v. 55, p. 272-281, 2001.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853-858, 2000.

NAITO, Y. et al. Selfing and inbreeding depression in seeds and seedlings of *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae). **Journal of Plant Research**, v. 118, p. 423-430, 2005. doi: 10.1007/s10265-005-0245-z.

NASON, J. D.; HAMRICK, J. L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of neotropical canopy trees. **J. Heredity**, London, v. 88, p. 264-276, 1997.

NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, Lancaster, v. 29, p. 1-10, 1975.

NEWTON, A. C. et al. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 14, p. 140-145, 1999.

NEWSTROM, L. E., FRANKIE, G. W.; BAKER, H. G. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical forest trees at La Selva, Costa Rica. **Biotropica**, Washington, v. 26, p. 141-159, 1994.

NUNNEY, L.; CAMPBELL, K. A. Assessing minimum viable population size: Demography meets population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 8, p. 234-239, 1993.

OHSAKI, A. et al. The isolation and *in vivo* potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorfi* Desf. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Tokyo, v. 4, p. 2889-2892, 1994.

OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, D.; ROSADO, S. C. S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaiba langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 331-338, 2002.

PAIVA, L. A. et al. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* i oleoresin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal Ethnopharmacol**, Amsterdã, v. 62, p. 73-78, 1998.

PEDRONI, F.; SANCHEZ, M.; SANTOS, F. A. M. Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – LEGUMINOSEAE, CAESALPINIOIDEAE) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, p. 183-194, 2002.

PONTES, A. B. et al. Emulsão dermatológica à base de copaíba. **Revista Analytica**, São Paulo, p. 36-42, 2003.

PLOWDEN, C. Production ecology of copaíba (*Copaifera* spp) oleoresin in the eastern Brazilian Amazon. **Economic Botany**, New York, v. 57, p. 491-501, 2003.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Planta, 2006. 328p.

QUESADA, M.; FUCHS, E.; LOBO, J. Pollen load size, reproductive success and progeny kinship of natural pollinated flowers of the tropical dry forest tree, *Pachira quinta*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 88, p. 2113-2118, 2001.

RAJORA, O. P. et al. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobes*) in Ontario, Canada. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 339-348, 2000.

RIBEIRO, M.C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, Barking, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C.; WADT, P. G. S.; WAD, L. H. O. Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp) de populações naturais do sudoeste da Amazônia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 4, p. 583-591, 2006.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequency using independent loci. **Heredity**, London, v. 47, p. 35-52, 1981.

RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, Lancaster, v. 43, p. 848-859, 1989.

RITLAND, K. Estimation of gene frequency and heterozygosity from pooled samples. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 2, p. 370-372, 2002.

ROUSSET, F. Genetic differentiation between individuals. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 13, p. 58-62, 2000.

SANGUINETTI, C. et al. RAPD silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamde gels. **Biotechniques**, Natick, v. 17, p. 914-921, 1994.

SANTOS, N. Fenologia. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 31, p. 223-226, 1979.

SAS INSTITUTE. **SAS procedures guide**: Version 8 (TSMO). Cary, 1999.

SEBBENN, A. M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista Instituto Florestal**, São Paulo, v. 14, p. 115-132, 2002.

SEBBENN, A. M. Número de populações para conservação genética *in situ* de espécies arbóreas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 15, p. 45-51, 2003.

SEBBENN, A.M. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: HIGA, A. R.; SILVA, L. **Pomares de sementes de espécies nativas**, Curitiba: FUPEF, p. 193-198, 2006.

SEBBENN, A. M. et al. Low level of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, London, v. 106, p. 134-145, 2011. doi: 10.1038/hdy.

SEOANE, C. E. C.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema reprodutivo em populações de *Esenbeckia leiocarpa*. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 13, p. 19-26, 2001.

SILVA, M. C.; CASTELETI, C. H. M. Estado da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, C. (Eds.). **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 2005. p. 43-59.

SILVA, M. B. et al. Genetic effects of selective logging and pollen gene flow in a low-density population of the dioecious tropical tree *Bagassa guianensis* in the Brazilian Amazon. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, p. 1548-1558, 2008. doi:10.1016/j.foreco.2007.11.012

SILVA, C. R. S. et al. **Understanding the genetic diversity, spatial genetic structure and mating system at the hierarchical levels of fruits and individuals of a continuous *Theobroma cacao* population from the Brazilian Amazon**. London: Heredity, 2011.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 16, p. 393-430, 1985.

SMOUSE, P. E.; SORK, V. L. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 197, p. 21-38, 2004.

STEPHENSON, A. G. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 12, p. 253-279, 1981.

STREIFF, R. A. et al. Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 831-841, 1999.

TAPPER, P. G. Irregular fruiting in *Fraxinus excelsior*. **Journal of Vegetation Science**, Edinburgh, v. 3, p. 41-46, 1992.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, L. J. **Fundamentos em ecologia**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 502 p.

VEIGA JÚNIOR, V. F. et al. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, n. 6, p. 476-480, 2001.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera*. **Química Nova**, São Carlos, v. 25, p. 273-286, 2002.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analysis in plant populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 921-935, 2004.

VIANA, V. M.; TABANEZ, A. A. J.; MARTINS, J. L. A. Restauração e manejo de fragmentos florestais. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2., São Paulo, 1992. **Anais...** São Paulo: Instituto Florestal de São Paulo, 1992. p. 400-407.

VIANA, V. M. Conservação da biodiversidade de fragmentos de florestas tropicais em paisagens intensivamente cultivadas. In: FONSECA, G. A. B. et al. (Orgs.). **Abordagens interdisciplinares para a conservação da biodiversidade e dinâmica do uso da terra no novo mundo**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; Gainesville: University of Florida, 1995. p. 135-154.

WANG J. et al. Novel polymorphic microsatellite loci and patterns of pollen-mediated gene flow in an ex situ population of *Eurycorymbus cavaleriei* (Sampindaceae) as revealed by categorical paternity analysis. **Conservation Genetics**, New York, v. 9, p. 559-567, 2007. doi: 10.1007/s10592-007-9369-0

WEIR, B.S. **Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer, 1996. 176 p.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, Austin, v. 28, p. 114-138, 1943.

WRIGHT, S. Isolation by distance under diverse systems of mating. **Genetics**, Austin, v. 31, p. 39-59, 1946.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v. 15, p. 323-354, 1951.

WHITE, G. M.; BOSHIER, D. H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 1899-1909, 1999.

WHITE, G.M.; BOSHIER, D.H.; POWELL, W. Increased pollen flow counteracts fragmentation in tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 2038-2042, 2002. doi:10.1073/pnas.042649999

ZORZETTO, R. O verde clandestino. **Revista Pesquisa FAPESP**, São Paulo, n. 170, p. 50-53, abr. 2010.